

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ярошевич Игорь Александрович

**Структурно-конформационные состояния и спектральные
характеристики каротиноида в фотоцикле оранжевого
каротиноидного белка цианобактерий**

03.01.02 - Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор, член-корреспондент РАН
Рубин Андрей Борисович

Москва — 2020

Оглавление

Введение.....	3
Цели и задачи исследования.....	6
Научная новизна и практическая значимость работы.....	6
Личный вклад автора.....	7
Положения, выносимые на защиту.....	7
Апробация работы.....	7
Публикации.....	7
Глава 1. Обзор литературных данных.....	8
1.1 Общие сведения о каротиноидах.....	8
1.1.1 Основное электронное состояние каротиноидов S0 и их конформация.....	11
1.1.2 Низшие возбужденные электронные состояния каротиноидов.....	14
1.1.2.1 Кинетика низших возбужденных электронных состояний каротиноидов.....	19
1.1.2.2 Влияние локального окружения и конформации на спектральные свойства каротиноидов.....	22
1.1.3 Протонированные формы каротиноидов.....	22
1.2 Белковые комплексы с каротиноидами.....	24
1.2.1 Оранжевый каротиноидный белок (ОСР).....	27
1.2.2 Фотоцикл ОСР.....	36
1.2.3 Механизм фотоактивации ОСР.....	37
Глава 2. Методы исследования.....	38
2.1 Вид волновой функции и базисное пространство для поиска волновой функции.....	40
2.1.1 Метод BSSE.....	41
2.2 Метод самосогласованного поля (ССП).....	41
2.2.1 Метод Хартри-Фока-Рутаана.....	42
2.2.2 Учет конфигурационного взаимодействия.....	42
2.2.3 Теории Функционала Плотности (DFT).....	44
2.2.3.1 Учет дисперсионного взаимодействия D3.....	45
2.2.4 Теории Функционала Плотности, Зависящей от Времени (TDDFT).....	45
2.3 Оценка энергии водородной связи в возбужденном состоянии.....	47
2.4 Реализация методов исследования.....	48
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	49
3.1 Конформация основного электронного состояния каротиноидов.....	49
3.2 Энергия водородной связи с кетогруппой каротиноида в основном электронном состоянии S0.....	56
3.3 Расчет энергии возбужденных электронных состояний каротиноидов.....	58
3.3.1 Функциональная интерпретация полученных результатов.....	63
3.3.2 Влияние конформации каротиноида на сдвиг оптического спектра поглощения.....	65
3.4 Альтернативные механизмы разрыва водородной связи на первичном этапе фотоактивации ОСРо.....	67
3.5 Влияние внешнего электростатического поля на сродство к протону кетогруппы каротиноида PA _{ECN}	71
3.5.1 Влияние белкового окружения на энергию переноса протона на каротиноид.....	73
4. Заключение.....	78
Выводы.....	79
Список рецензированных работ, опубликованных автором по теме диссертации.....	80
Список литературных источников.....	81

Введение

Работа, описанная в этой диссертации, посвящена исследованию молекулярных свойств каротиноидов и, в частности, особенностей их взаимодействия со светом в составе каротинопротеина Оранжевый Каротиноидный Белок (*Orange Carotenoid Protein, OCP*). Каротиноиды представляют собой многочисленный класс биогенных пигментов – метаболитических производных изопрена. Эти соединения синтезируются клетками бактерий, растений и грибов. Животные не способны синтезировать каротиноиды, однако зачастую нуждаются в них и должны получать эти пигменты с пищей. Структурно они являются плоскими вытянутыми молекулами с типичными линейными размерами 5 Å на 30 Å. Эта характерная особенность обеспечена линейной π-сопряженной цепью в их составе, которая обычно содержит 9-11 двойных связей. Развитая π-сопряженная цепь обуславливает положение спектра поглощения этих молекул в сине-зеленой области, что обеспечивает характерный оранжево-красный цвет каротиноидов (название группы этих пигментов происходит от англ. carrot - «морковь», ведь оранжевый цвет корнеплода этого растения обеспечен входящим в его состав каротиноидом β-каротином). Каротиноиды являются гидрофобными молекулами и в живых клетках локализуются в гидрофобной части липидных мембран, жирных каплях или в комплексах с белками.

Строение каротиноидов непосредственно связано с их биологическими функциями, основными из которых являются:

1. Структурная функция. Благодаря своей липофильности и “жесткой” структуре каротиноиды могут прочно связывать и армировать белки и мембраны;
2. Антиоксидантная функция. Благодаря длинной сопряженной цепи каротиноиды способны эффективно тушить как радикальные активные формы кислорода, так и синглетный кислород;
3. Светособирающая функция – это специфическая функция каротиноидов в фотосинтетическом аппарате. Поглощая сине-зеленую часть спектра солнечного света, эти молекулы способны передавать энергию электронного возбуждения на молекулы хлорофилла, что эффективно увеличивает спектральный диапазон энергии, идущей на фотосинтез;
4. Фотозащитная функция — еще одна специфическая функция каротиноидов в фотосинтетическом аппарате. В условиях избытка освещения каротиноиды способны выступать акцептором энергии по отношению к возбужденной молекуле хлорофилла, дезактивируя ее.

Этот защитный механизм, предохраняющий молекулы хлорофилла от разрушения в процессе фотоокисления, крайне важен для адаптации фотосинтезирующих организмов к меняющимся условиям окружающей среды.

5. Метаболическая функция. Например, ретинол (витамин А) является производным каротиноидов.

Стоит отметить важную роль каротиноидов в физиологии зрения. Ретиналь — производное β-каротина, которое является основным пигментом зрительных рецепторов — опсинов. Несмотря на то, что ретиналь формально не относится к классу каротиноидов, структурно и оптически они очень сходны. Каротиноиды также выступают в качестве оптических фильтров: макула глаза содержит два специфических каротиноида зеаксантин и лютеин, которые составляют макулярный пигмент. Именно из-за локализации в этой области каротиноидов макула имеет название «желтое пятно». Считается, что каротиноиды в составе макулы призваны отсекают наиболее «опасную» для зрения синюю часть оптического диапазона, прежде чем свет попадет на слой рецепторных клеток сетчатки. В заключение обсуждения биологической роли каротиноидов хочется отметить их значение в биологии поведения. Как было отмечено ранее, каротиноиды не синтезируются в организмах животных, но поступают с пищей и могут накапливаться в наружных покровах (это особенно характерно для птиц и ракообразных). Яркая окраска, которая достигается за счет богатой каротиноидами пищи, зачастую является необходимой для прохождения полового отбора и закрепляется в популяции в качестве доминантного фенотипа (ярким примером являются характерная розовая окраска обыкновенного фламинго *Phoenicopterus roseus*).

В клетках сине-зеленых водорослей ключевую роль в защите от повреждающих доз света играет каротинопротеин ОСР. ОСР является водорастворимым фоторецептором массой 35 кДа, который в качестве кофактора нековалентно связывает циклические кето-каротиноиды. К кофакторам этого белка относятся такие каротиноиды как эхиненон (*echinenone, ECN*), 3'-гидроксиэхиненон (*3'-hydroxiechinenone, 3hECN*) и кантаксантин (*canthaxantin, CAN*). При облучении интенсивным сине-зеленым светом этот белок переходит в физиологически активное (*OCP-red, OCP_r*) состояние. В этом состоянии ОСР способен связаться с фотосинтетической антенной и перенаправить поток энергии возбуждения на связанный кето-каротиноид. Это позволяет перевести чрезмерную световую энергию в тепло и избежать повреждения фотосинтетического аппарата. В темноте форма *OCP_r* самопроизвольно переходит в неактивное состояние (*OCP-orange, OCP_o*). В форме *OCP_o* белок локализуется в цитозоле клетки и не способен связаться с фотосинтетической антенной. Этот фоторецептор представляет большой

интерес по ряду причин. Во-первых, представляется, что на его основе могут быть созданы системы транспортировки и адресной доставки каротиноидов и других липофильных молекул. Во-вторых, ОСР — практически готовый фотопереключателъ, что, учитывая его небольшую массу, делает этот белок перспективным агентом для оптогенетики. В-третьих, на основе ОСР возможно создание оптических зондов, с помощью которых при помощи измерения скорости перехода между состояниями ОСРо и ОСРг можно судить о свойствах локального окружения этого белка.

Конечно, для эффективного использования и направленного изменения свойств ОСР необходимо детальное понимание механизма его работы. В настоящее время на основании различных экспериментальных данных следующие представления в отношении фотоцикла ОСР являются общепринятыми:

1. Структура неактивной формы ОСРо известна — это компактный белок, существующий как в мономерном, так и димерном виде, а каротиноид помещен в гидрофобный карман, пронизывающий оба домена белка вдоль длинной оси;

2. Для фотоактивации ОСР характерен квантовый выход порядка 0.3 %;

3. Образование активной формы ОСРг из неактивной ОСРо характеризуется большими структурными изменениями, в том числе полной диссоциацией каротиноида и С-домена белка, которая сопровождается транслокацией пигмента на 12 Å относительно белкового остова;

4. Образованию физиологически активной формы ОСРг предшествует несколько интермедиатов с характерными временами образования от пс до мс.

Эта диссертационная работа направлена на теоретическое изучение молекулярных свойств каротиноидов с целью дополнения представлений о возможных механизмах работы фоторецептора ОСР. В качестве теоретического метода исследования использована вычислительная квантовая химия.

Цели и задачи исследования

Целью работы является изучение методами вычислительной квантовой химии механизма структурно-конформационных изменений и спектральных характеристик каротиноида в составе фоторецептора ОСР.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать характер конформационных переходов в сопряженной цепи каротиноида и соответствующий энергетический профиль в основном S_0 и возбужденном S_2 электронных состояниях;
2. Исследовать характер взаимной ориентации каротиноида и аминокислотных остатков тирозина и триптофана в молекулярном комплексе и определить энергию водородных связей в этом комплексе;
3. Провести теоретический анализ механизмов фотодиссоциации водородной связи между каротиноидом и аминокислотными остатками тирозина и триптофана на ранних этапах фотоцикла ОСР.

Научная новизна и практическая значимость работы

В работе изучен характер конформации сопряженной цепи каротиноида и взаимной ориентации в молекулярном комплексе между каротиноидом и парой аминокислотных остатков белка ОСР. Оценена внутренняя энергия основного и возбужденного электронных состояний циклических кето-каротиноидов в соответствующих конформациях. Показана особая роль вращения β -ионового кольца относительно плоскости сопряженных связей кето-каротиноидов и влияние различных конформационных состояний β -ионового («паккерные» состояния) кольца на форму поверхности потенциальной энергии. Показано, что вращение каротиноида вокруг псевдо-одинарных связей приводит к сдвигу полосы его оптического поглощения в синюю область, а вращение каротиноида вокруг псевдо-двойных связей приводит к сдвигу полосы в красную область, что в совокупности приводит к батохромному сдвигу спектра поглощения формы ОСРг по отношению к форме ОСРо. Вычислена величина батохромного сдвига спектра поглощения каротиноида при образовании водородных связей между с остатками тирозина и триптофана. Показано, что протонирование кетогруппы каротиноида приводит к сильному батохромному сдвигу полосы поглощения этого пигмента. Предложены два гипотетических механизма разрыва водородных связей на первых этапах фотоцикла ОСР. Показано, что учет влияния электрического потенциала, образованного аминокислотными остатками белка, влияет оценку сродства к протону кетогруппы каротиноида.

Личный вклад автора

Все расчеты в рамках методов вычислительной квантовой химии, обработка полученных данных, интерпретация результатов, формулирование гипотез и оценка их вероятности выполнены автором самостоятельно. Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов осуществлялось совместно с научными руководителем д. б. н., профессором Рубиным А.Б.

Положения, выносимые на защиту

1. Локальное окружение и набор конформаций сопряженной цепи каротиноида в ОСР, определяет степень эффективного π -сопряжения и величину батохромного сдвига спектра поглощения формы при переходе формы ОСРо в форму ОСРг;

2. В отсутствие водородных связей с аминокислотными остатками наблюдается существенный гипсохромный сдвиг спектра поглощения каротиноида. Это свидетельствует о низкой вероятности разрыва водородной связи по классическому механизму молекулярной фотодиссоциации на поверхности возбужденного состояния S_2 ;

3. В предложенном в работе механизме фотодиссоциации водородных связей предполагается перенос протона на каротиноид, с образованием протонированной катионной формы. Это вызывает сильный батохромный сдвиг спектра поглощения пигмента. Электростатический потенциал, созданный аминокислотными остатками белкового окружения каротиноида, увеличивает сродство к протону кетогруппы, что способствует переносу протона от аминокислот на каротиноид.

Апробация работы

Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на Российских и международных конференциях: International Workshop «Computational and Theoretical Modeling of Biomolecular Interactions» (Дубна — 2013), V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону — 2015), VI Съезд биофизиков России (Краснодар — 2019), Russian Supercomputing Days (Москва — 2019).

Публикации

По материалам работы опубликовано 5 рецензированных статей в журналах и сборниках, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RCSI.

Глава 1. Обзор литературных данных

1.1 Общие сведения о каротиноидах

Каротиноиды, наряду с хлорофиллом, являются наиболее распространенными органическими пигментами в природе. Они присутствуют в подавляющем большинстве организмов, включая человека, но синтезируются только прокариотами, растениями и грибами [Vershinin, 1999]. Каротиноиды можно обнаружить как в липидных мембранах и липосомах, так и в составе белковых комплексов. Структурно эти вещества относятся к классу терпеноидов, которые могут содержать различное количество π -сопряженных связей и заместителей. Из биологических объектов выделено более 750 различных каротиноидов [Britton, 2004], и это число растет из года в год. Обширный класс каротиноидов делят на подклассы в соответствии с их структурой. Каротиноиды, содержащие только углеводородные заместители, называют *каротинами*, а имеющие в своем составе атомы кислорода – *ксантофиллами*. Кислород в ксантофилле чаще всего входит в состав гидроксильной, кетонной или эпоксидной группировки. По характеру концевой группы каротиноиды делят на ациклические и циклические. К циклическим каротиноидам относят структуры, содержащие хотя бы одну циклизованную группу, которая часто представлена β -иононовым кольцом (β на Рис. 1.1). Типичная схема строения каротиноида представлена на рисунке 1.1.

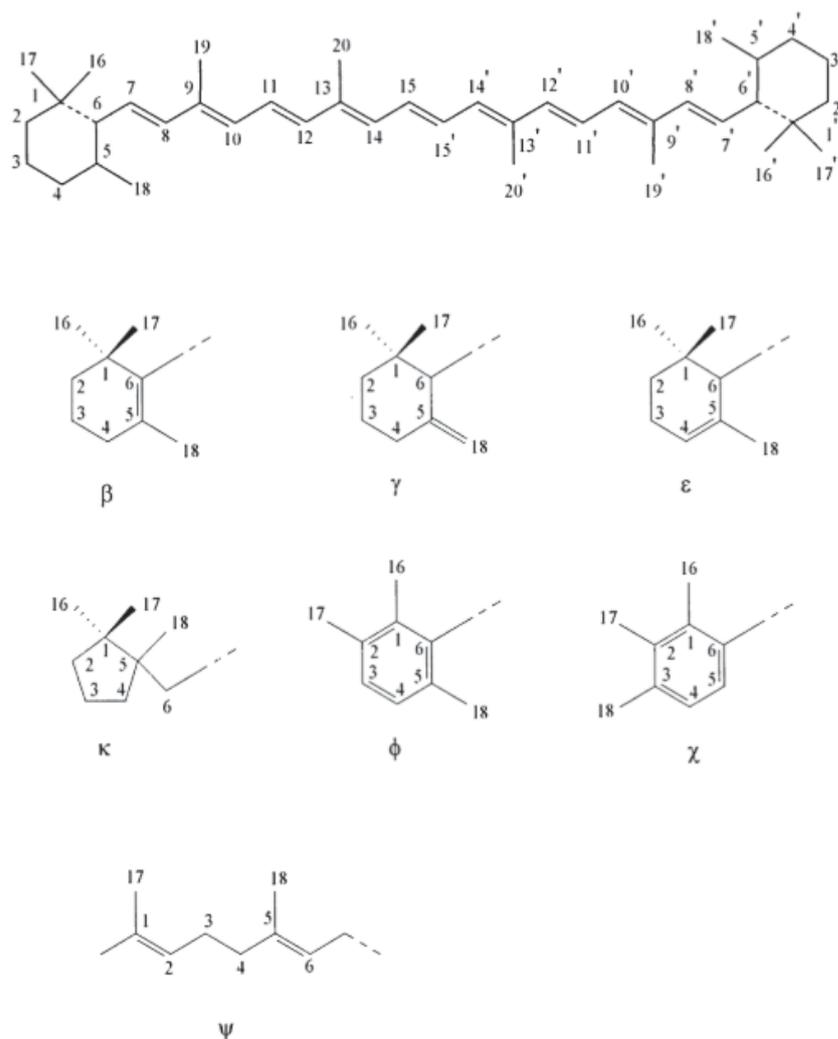


Рисунок 1.1. Типичное строение каротиноида и нумерация его атомов (сверху). Боковая группа может быть представлена шестичленным циклом (β , γ , ϵ , ϕ , χ), пятичленным циклом (κ) либо линейной группой (ψ) [Britton, 2004]

К основным биологическим функциям каротиноидов относятся:

1. Структурная функция. Каротиноиды — липофильные либо амфифильные “жесткие” линейные молекулы, благодаря чему они способны армировать белки и мембраны с которыми связаны [Navaux, 1998; Maksimov и др., 2007].

2. Антиоксидантная функция. Каротиноиды способны эффективно тушить как радикальные активные формы кислорода, так и синглетный кислород [Miller и др., 1996; Sedoud и др., 2014; Young, Lowe, 2001]. В акте тушения свободного радикала образуется инертный каротиноид-радикал, неподеленный электрон которого стабилизирован π -сопряженной системой. Такой каротиноид-радикал отличается своей химической инертностью, поэтому реакция радикала с каротиноидом эквивалентна обрыву цепи свободнорадикальной реакции. По отношению к синглетному кислороду каротиноиды выступают в роли спин-катализатора,

переводя кислород из возбужденного синглетного в основное триплетное состояние. В роли акцептора энергии возбуждения синглетного кислорода выступает низколежащий триплетный электронный уровень каротиноидов [Conn, Schalch, Truscott, 1991]. В процессе тушения происходит направленный перенос энергии возбуждения с одновременным изменением мультиплетности каротиноида и кислорода, в результате чего образуется инертная пара триплетный кислород - триплетный каротиноид.

3. Светособирающая функция – это специфическая функция каротиноидов в фотосинтетическом аппарате. Связанные с белками светособирающего комплекса каротиноиды выступают в качестве дополнительных светособирающих антенн, которые позволяют поглощать свет в более широком диапазоне длин волн [Siefertmann-Harms, 1987; Hofmann и др., 1996]. Пигмент возбуждается синим светом, возникшее электронное возбуждение способно мигрировать на молекулы хлорофилла, и далее по молекулам хлорофилла антенны на димер хлорофилла (специальную пару), которая в возбужденном состоянии выступает донором электрона в цикл фотосинтеза. Включение каротиноидов в состав антенны позволяет расширить спектральный диапазон возбуждения светособирающего комплекса, сдвинув коротковолновую границу до 350 нм.

4. Фотозащитная функция — еще одна специфическая функция каротиноидов в фотосинтетическом аппарате. В условиях избытка электронного возбуждения каротиноид может выступать акцептором энергии по отношению к возбужденной молекуле хлорофилла, дезактивируя ее [Siefertmann-Harms, 1987]. Этот защитный механизм, предохраняющий молекулы хлорофилла от разрушения в процессе фотоокисления, крайне важен в условиях избыточной освещенности и зависит от состава каротиноидов, связанных с антенной [Daddy и др., 2015; Demmig-Adams, Gilmore, Adams, 1996; Dilbeck и др., 2016; Niedzwiedzki и др., 2016].

5. Различные функции, связанные с биологической активностью [Stahl, Ale-Agha, Polidori, 2002]. Это класс частных метаболических функций каротиноидов, например: β -каротин является про-витамином А, а зеаксантин и лютеин светофильтрами в макуле глаза [Landrum, Bone, 2001; Lintig von и др., 2010; Lintig Von, 2012]; некоторые каротиноиды замедляют процессы биологического старения [Lee, Koo, Min, 2004; Tanumihardjo, 2013]; стимулируют иммунный ответ [Marín-Medina и др., 2016; Navara, Hill, 2003]; обладают противоопухолевым действием [Juonouchi и др., 2000].

Первые две функции (неспецифические) могут выполняться практически любыми каротиноидами, а третья и четвертая (специфические) являются взаимоисключающими. Роль каротиноида в качестве светособирающего либо тушащего пигмента определяется его молекулярным строением. Для понимания связи строения и функций этих пигментов

необходимо рассмотреть не только основное электронное состояние этих каротиноидов S0, но и низшие возбужденные электронные состояния T, S1, ICT и S2. Теоретические представления о строении каротиноидов происходят от теории строения полиенов, ввиду того, что основным определяющим структурным элементом этих молекул является длинная π-сопряженная цепь.

1.1.1 Основное электронное состояние каротиноидов S0 и их конформация

Представления о конформации и механических свойствах полиенов были сформированы в первой половине 1980-х годов. Принципиально π-сопряженная цепь полиенов может содержать сколь угодно большое число пар sp²-гибридизованных атомов углерода (Рис. 1.2.1 А). С формальной точки зрения π-сопряженная цепь состоит из чередующихся двойных и одинарных связей (цепь начинается двойной связью, второй атом образует с третьим одинарную связь, третий с четвертым двойную связь и т. д.). В организации двойной связи участвуют две пары электронов: одна пара обеспечивает σ-связь, она образована sp²-орбиталями и направлена вдоль линии, соединяющей атомные ядра; вторая пара обеспечивает π-связь, она образована p-орбиталями и локализована над и под плоскостью трех sp²-орбиталей. Одинарная связь организована только одной парой электронов, образующей σ-связь. Максимальное перекрывание p-орбиталей достигается в том случае, когда все четыре заместителя пары связанных атомов находятся в одной плоскости. Отклонение от плоской конформации вдоль двойной связи энергетически не выгодно, что приводит к появлению барьера вращения между двумя возможными плоскими ориентациями, которые носят названия цис- и транс-конформаций (конформации различимы только в случае разных заместителей). Наличие барьера вращения между двумя плоскими конформациями является характерной особенностью двойных связей, но в случае π-сопряженных молекул этим свойством обладают и одинарные связи сопряженной цепи (Рис. 1.2.1 Б, Г) [Durig, Church, Compton, 1979; Fateley и др., 1965; Wyman, 1955]. Этот факт объясняется тем, что сопряженная цепь не соответствует формальной схеме ее изображения, где двойные связи чередуются с одинарными. Она состоит из ряда sp²-гибридизованных атомов углерода, которые донируют один электрон, локализованный на p-орбитали, для организации π-связи и энергетически выгодное перекрывание осуществляется как с правым, так и с левым соседом вдоль цепи. Эти представления позволили описать строение энергетической поверхности вдоль координаты вращения бутадиена и наличие у этой молекулы двух состояний относительно одинарной связи (Hudson, Kohler, & Schulten, 1982). В полиенах и каротиноидах энергетический барьер вращения вдоль одинарных связей зачастую в 2-3 раза ниже, чем барьер вращения вдоль двойных связей, что указывает на меньшее сопряжение между этими парами атомов [Carrillo и др., 2017; Guo, Tu, Hu, 2008; Rao, Darsey, Kestner, 1983; Tai, Allinger, 1976].

Дополнительным доказательством π -сопряжения, возникающего между соединенными одинарной связью парами атомов цепи полиена, является изменение равновесных длин связей (*Bond Length Alternation, BLA*) [Götze, Thiel, 2013; Hashimoto и др., 2002; Milián-Medina, Gierschner, 2012; Zhao, Truhlar, 2008].

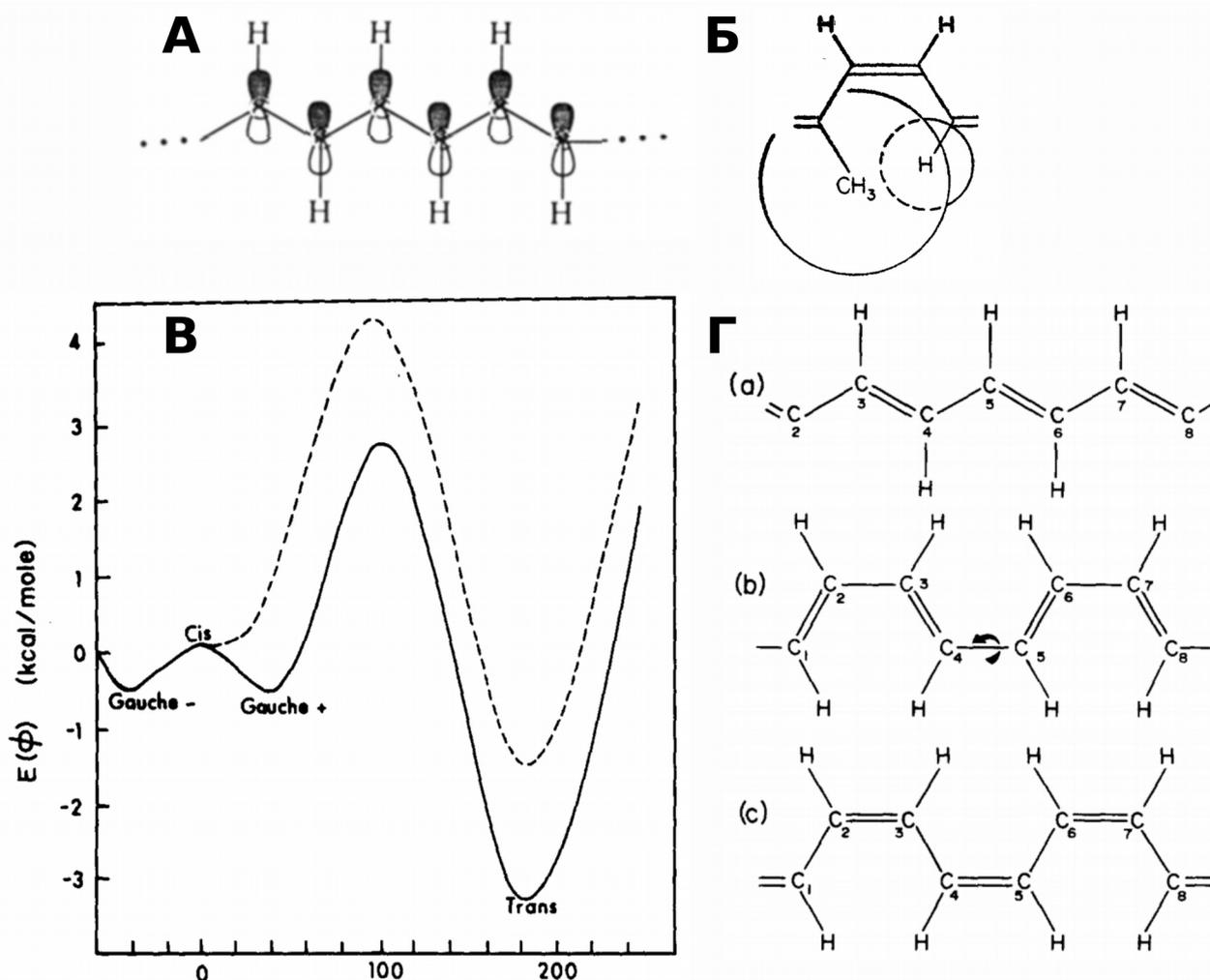


Рисунок 1.2.1. А — цепь sp^2 -гибридизованных атомов углерода [Kohler, 1993]. Б — схема дисперсионного взаимодействия между расположенными близко заместителями сопряженной цепи [Wyman, 1955]. В — типичный потенциал вращения вокруг одинарной связи сопряженной цепи, транс-конформация (Trans) является более энергетически выгодной чем цис-конформация (Cis). Потенциал вращения может иметь только одну цис-конформацию (пунктирная линия), либо, ввиду отталкивания ближайших заместителей, цис- может быть расщеплена на две гауш-конформации (Gauche -/+), которые немного повернуты (сплошная линия) [Rao, Darsey, Kestner, 1983]. Г — схема полностью транс-конформации полиена (а), цис-конформации одинарной связи (б), цис-конформации двойной связи (с) [Rao, Darsey, Kestner, 1983].

Структурные данные указывают на удлинение двойных связей и укорочение

одинарных. Сила этого эффекта зависит от длины сопряженной цепи и характера заместителей. Обычно ближе к краям сопряженной цепи эффект BLA ослабевает (Рис. 1.2.2). Равнозначность sp^2 -гибридизованных атомов цепи полиена стирает четкие границы между двойными и одинарными связями. Тем самым структура каротиноидов, как и полиенов, обусловлена сопряжением π -электронов, которые эффективно связывают все атомы цепи и удерживают молекулу в одной плоскости.

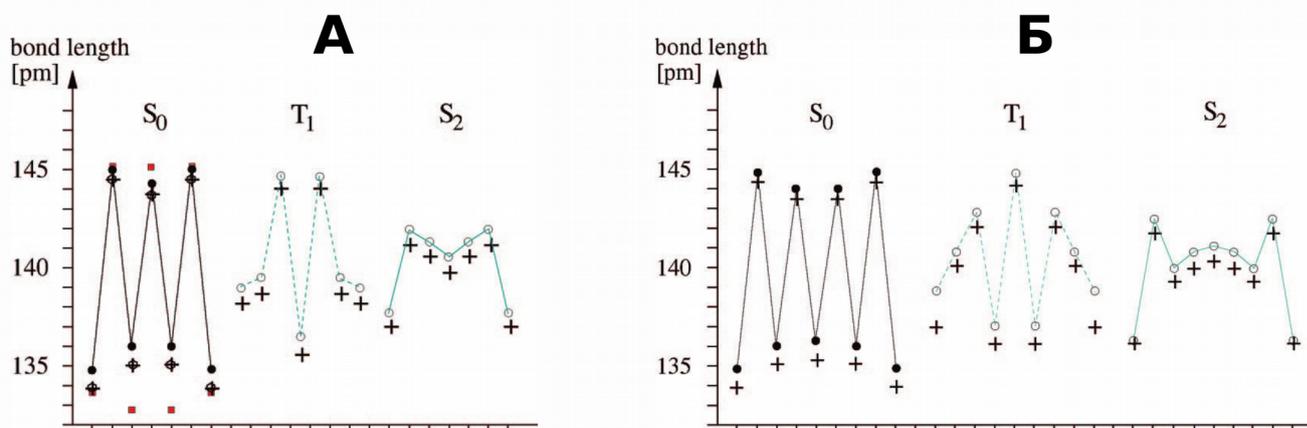


Рисунок 1.2.2. — схема изменения равновесной длины связей сопряженной цепи в основном электронном состоянии S_0 , низшем триплетном состоянии T_1 и оптически активном состоянии S_2 . Ось ординат соответствует номеру связи в сопряженной цепи. Октатетраен (А) содержит 7 связей сопряженной цепи (4 двойные — короткие и 3 одинарные — длинные), декапентаен (Б) 9 (5 и 4 соответственно) сопряженных связей [Marian, Gilka, 2008].

Еще один эффект, который определяет структуру каротиноидов, это дисперсионное взаимодействие между близко расположенными заместителями (Рис. 1.2.1 Б). Отталкивание ближайших заместителей делает цис-конформацию менее выгодной по отношению к транс-конформации, что справедливо и для двойных, и для одинарных связей сопряженной цепи, поэтому каротиноиды в природе чаще всего встречаются в полностью-транс-конформации [Britton, 2004; Britton, Liaaen-Jensen, Pfander, 2009]. Исключением является конформация связи между атомами С6-С7 (нумерация представлена на Рис. 1.1) каротиноидов, содержащих циклические боковые группы. Из-за специфического расположения боковых заместителей зачастую энергетически более выгодной становится цис-конформация вдоль С6-С7 одинарной связи (Рис. 1.3 А) [Liu и др., 2008; Lukeš и др., 2011; Mori, 2016].

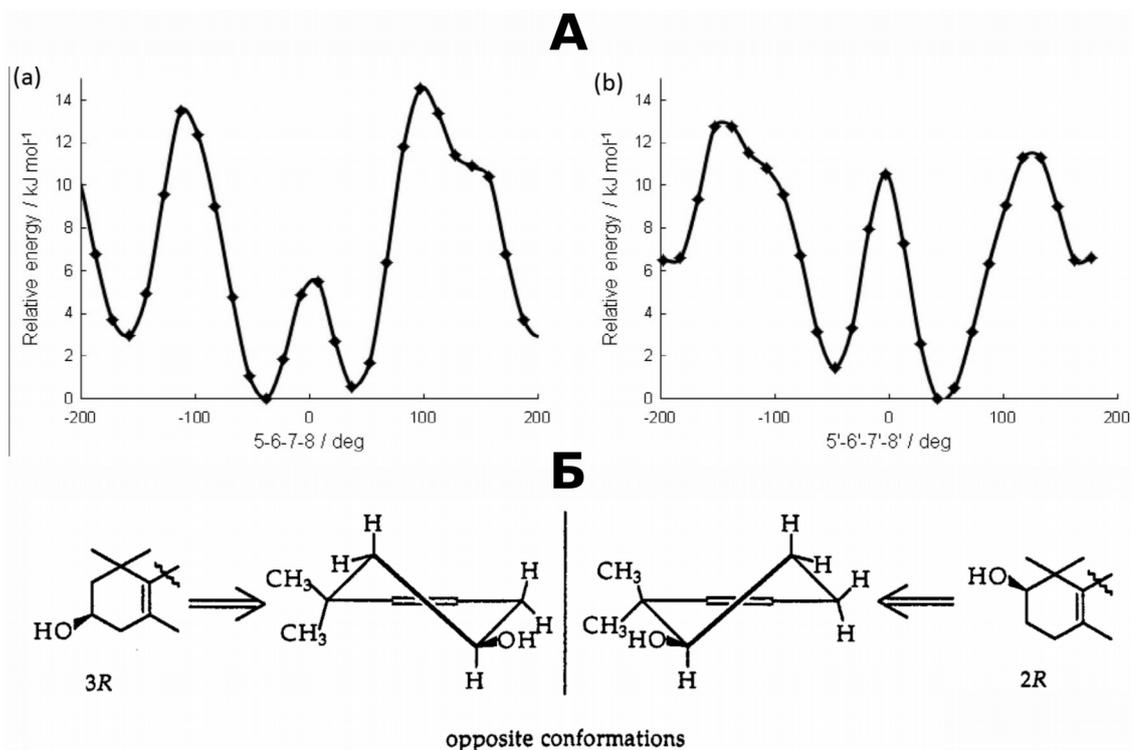


Рисунок 1.3. А — потенциал вращения боковой концевой группы вокруг связи С6-С7. Цис-конформации (окрестность 0° — гош+/-) энергетически более выгодны, чем транс-конформации (окрестность 180°). Представлены потенциалы вращения β-кольца, содержащего кетогруппу в положении С4 (а) и содержащего гидроксигруппу в положении С3 (б) [Mori, 2016]. Б — схематическое изображение различных конформаций β-кольца [Liaaen-Jensen, 1997].

Ещё одним аспектом структуры каротиноидов является конформация циклической группы. Боковой цикл чаще всего содержит 6 атомов. Для них характерна как sp²-, так и sp³-гибридизация, что позволяет циклической группе принимать несколько конформаций (Рис. 1.3 Б) [Landrum и др., 2010; Liaaen-Jensen, 1997]. Зачастую, благодаря большому барьеру перехода между альтернативными состояниями боковой циклической группы, переходами между этими состояниями можно пренебречь [Götze, Thiel, 2013; Kaczor, Baranska, 2011]

В разделе «Результаты» будет проанализировано влияние дисперсионного взаимодействия заместителей и конформации боковой циклической группы на барьер вращения и ВЛА кето-каротиноидов.

1.1.2 Низшие возбужденные электронные состояния каротиноидов

Спектр оптического поглощения и спектр комбинационного рассеяния каротиноидов, пример которых представлен на Рисунке 1.4, является источником информации как о молекулярном строении самого пигмента, так и о его локальном окружении [Frank, 2001; Kish и др., 2015]. Каротиноид, который поглотил квант света, либо получил энергию возбуждения от другого пигмента или от синглетного кислорода, переходит в одно из трех возбужденных

электронных состояний: S_2 , S_1 или T [Thrash, Fang, Leroi, 1979].

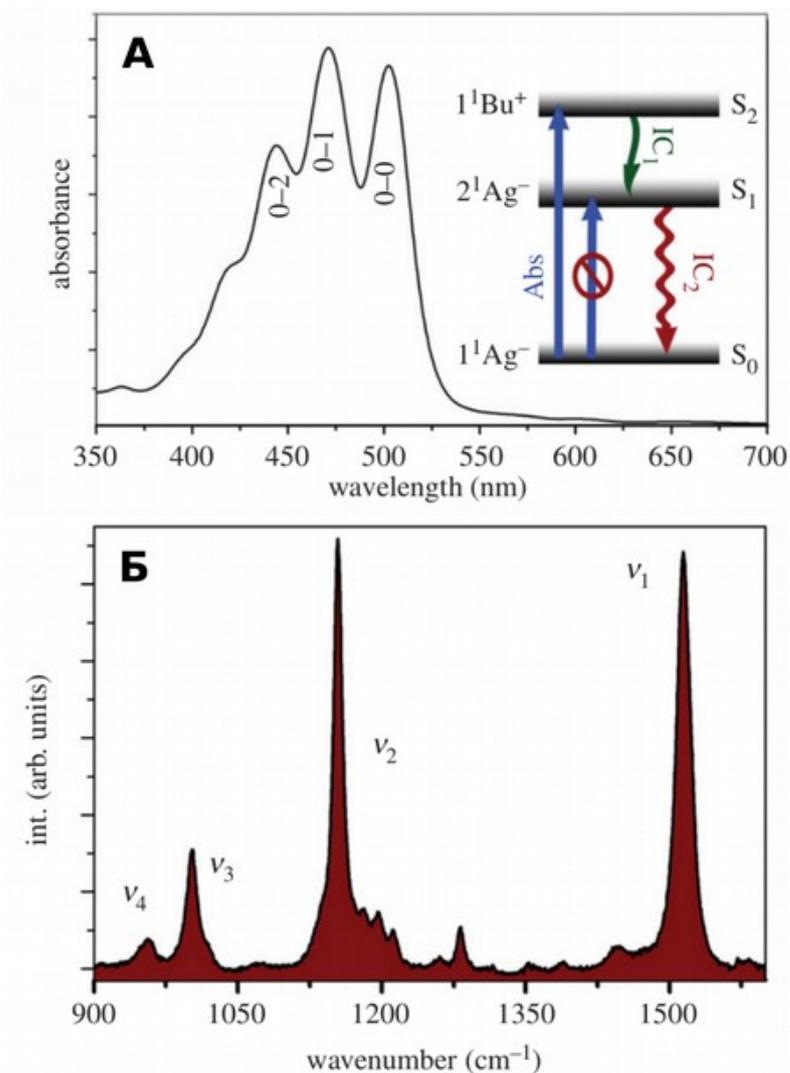


Рисунок 1.4. А — типичный спектр поглощения каротиноида и схема его возбужденных электронных уровней. Полоса поглощения имеет характерную вибронную структуру (пики 0-0, 0-1, 0-2). Она обусловлена переходом из основного электронного состояния S_0 ($1Ag^-$) в возбужденное состояние S_2 ($1Bu^+$). Образованное в результате поглощения кванта света состояние S_2 ($1Bu^+$) дезактивируется путем внутримолекулярной конверсии IC_1 в состояние S_1 ($2Ag^-$), которое тем же путем IC_2 дезактивируется с образованием основного состояния S_0 ($1Ag^-$). Поглощение кванта света и переход из основного состояния S_0 ($1Ag^-$) в S_1 ($2Ag^-$) запрещен ввиду одинаковой симметрии состояний [Llansola-Portoles, Pascal, Robert, 2017]. Б — типичный спектр комбинационного рассеяния каротиноидов. На графике отмечены характеристические моды: ν_1 (колебания двойных связей сопряженной цепи), ν_2 (колебания одинарных связей сопряженной цепи), ν_3 (колебания метильных групп в плоскости сопряженной цепи), ν_4 (колебания C–H вне плоскости) [Llansola-Portoles, Pascal, Robert, 2017].

Высшее из рассматриваемых возбужденных состояний — S_2 — обуславливает интенсивную полосу в спектре поглощения каротиноидов (Рис. 1.4 Б). В результате быстрой колебательной релаксации из состояния S_2 образуется S_1 состояние. S_1 состояние тоже дезактивируется в результате колебательной релаксации с образованием основного S_0 состояния. Состояние Т может образоваться из основного состояния S_0 в результате взаимодействия со спиновым катализатором, в качестве которого в биологических системах выступают синглетный кислород и триплетный хлорофилл. Практически все каротиноиды, выделенные из биологических объектов, выступают тушителями синглетного $a^1\Delta_g$ состояния кислорода [Miller и др., 1996]. Т состояние является долгоживущим и его можно считать основным уровнем триплетного состояния. Дезактивация Т состояния также требует спинового катализатора. Структура и свойства состояний S_2 , S_1 или Т подробно описаны для полиенов (Christensen, Barney, Broene, Galinato, & Frank, 2004; Bruce S. Hudson et al., 1982; Kohler, 1991, 1993; Lasaga, Aerni, & Karplus, 1980; Ohmine, Karplus, & Schulten, 1978). Электронное строение π -сопряженных систем удобно рассматривать с учетом симметрии относительно плоскости сопряженных связей. Σ -орбитали симметричны относительно операции отражения от плоскости сопряженной системы, а π -орбитали антисимметричны. Для описания свойств низших возбужденных электронных состояний линейных полиенов достаточно ограничиться рассмотрением только электронной подсистемы, обладающей π -симметрией (π -электронное приближение Хюккеля) [Purcell, Singer, 1967; YATES, 1978]. В таком приближении все электронные конфигурации плоских линейных полиенов, содержащие четное число электронов, будут относиться к одному из двух классов симметрии: A_g (четных) или B_u (нечетных). Основное электронное состояние линейных полиенов S_0 относится к классу A_g , его принято обозначать $1A_g$, имея в виду, что это низшее состояние этой симметрии. Низлежащее состояние $1B_u$ описывается как однократно-возбужденное относительно электронной конфигурации $1A_g$, в которой один электрон с высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО, *Highest Occupied Molecular Orbital*, *HOMO*) перенесен на низшую свободную молекулярную орбиталь (НСМО, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, *LUMO*) (Рис. 1.5 А). В результате перехода в $1B_u$ меняется симметрия, что делает это состояние оптически активным. Часто в случае других молекул такой переход (ВЗМО \rightarrow НСМО) определяет самое низкое возбужденное электронное состояние, но в случае полиенов и каротиноидов это не так. Описание причины практически полного отсутствия флюоресценции этих молекул вызвало затруднения (Frank, 2001; Tomas GILLBRO and Richard J. Cogdell, 1989). Если бы $1B_u$ было низшим возбужденным электронным состоянием, учитывая его оптическую активность, дезактивация этого состояния должна была бы сопровождаться испусканием кванта флюоресценции. Осмысление отсутствия

сигнала флюоресценции привело к появлению в схеме возбужденных состояний полиенов более низкого, чем 1Bu, и спектрально неактивного синглетного уровня S1 [Hudson, Kohler, 1972; Schulten, Karplus, 1972]. Состояние 1Bu было названо S2, т. к. оно перестало быть низшим синглетным возбужденным состоянием. Предполагалось, что уровень S2 безызлучательным образом переходит в состояние S1. Для первых оценок энергии этого состояния использовано эмпирическое правило энергетического интервала (*energy gap law*) (Englman & Jortner, 1970), которое позволяет оценить энергию S₁ (акцептора энергии возбуждения) по времени жизни состояния S₂ (донора энергии). Первое теоретическое описание уровня S1 было получено в рамках метода Паризера-Парра-Попла (Pariser-Parr-Pople или PPP) [Tavan, Schulten, 1987]. Электронное состояние S1 обладает симметрией Ag и является вторым по энергии электронным состоянием этой симметрии 2Ag. Совпадение симметрии состояний 1Ag и 2Ag объясняет спектральную неактивность перехода между ними. 2Ag не может быть выражено в рамках единой электронной конфигурации и является линейной комбинацией однократно-возбужденной Ag₃ (ВЗМО-НСМО+1) и двукратно-возбужденной Ag₂ (двукратный переход (ВЗМО-НСМО)) (Рис 1.5 Б). При этом прямой переход из основного 1Ag в возбужденное состояние 2Ag возможен при двухфотонном поглощении [Frank, 2001; Šebelík и др., 2019].

Энергия состояний T, 2Ag (S1) и 1Bu (S2) уменьшается с ростом числа звеньев в сопряженной системе. Обычно многократно возбужденные электронные состояния (как 2Ag) выше по энергии, чем однократно возбужденные состояния (как 1Bu), но в случае полиенов и каротиноидов это не так. Эта особенность может быть объяснена высокой делокализацией электронной плотности вдоль сопряженной системы, которая обеспечивает электронную корреляцию, энергия которой растет с ростом цепи. Двукратно возбужденные конфигурации состояния 2Ag сильнее стабилизируются при увеличении числа звеньев сопряженной цепи, что определяет характер взаимного расположения описанных электронных состояний для всех линейных полиенов длиннее гексатриена: E(1Ag)<E(2Ag)<E(1Bu) [Catalán, Paz, 2004]. В свою очередь для гексатриена и бутадиена последовательность электронных состояний имеет привычный вид: E(1Ag)<E(1Bu)<E(2Ag).

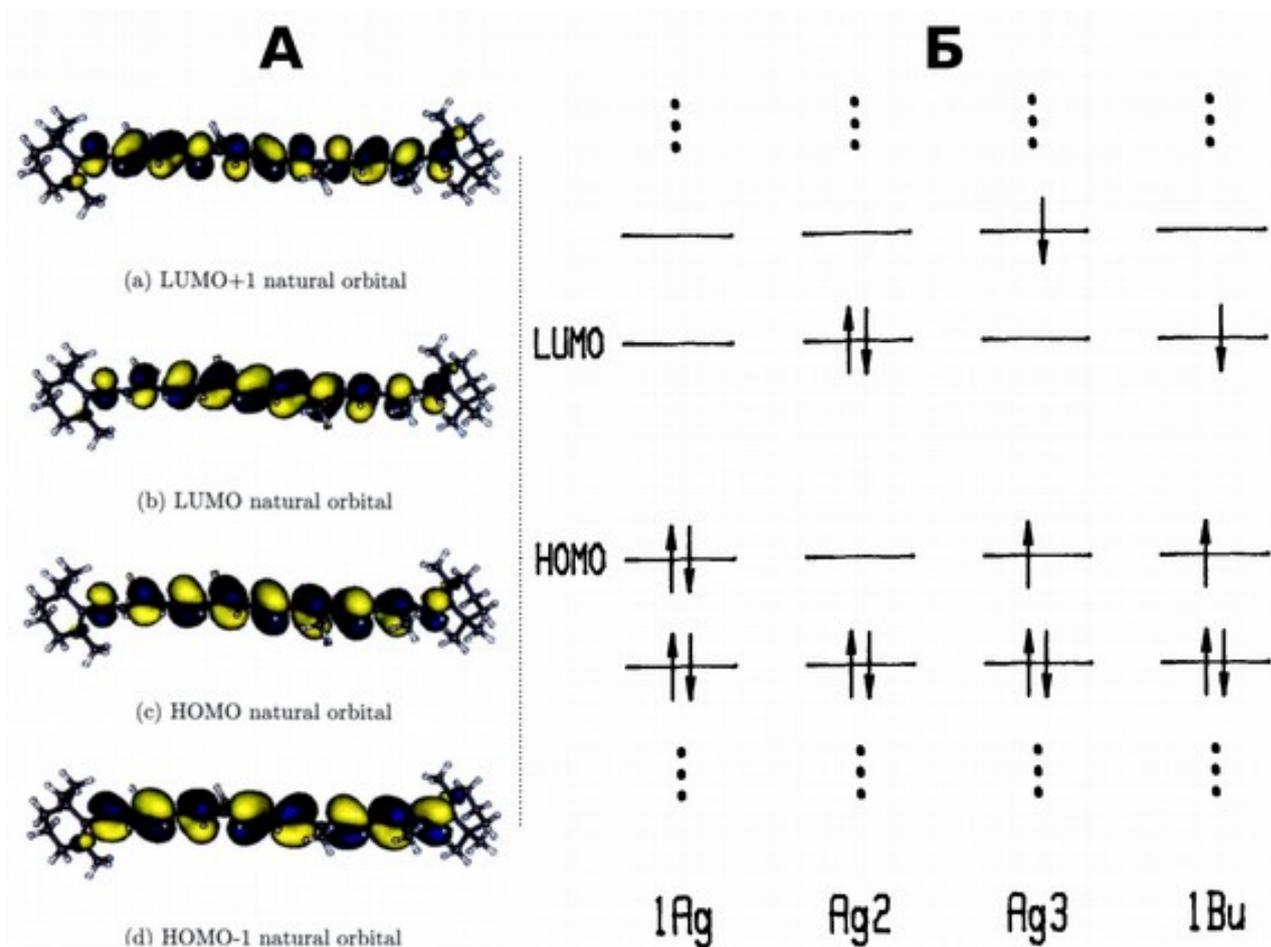


Рисунок 1.5. А — молекулярные орбитали β -каротина. ВЗМО-1 ((d)НОМО-1), ВЗМО ((c)НОМО), НСМО ((b)LUMO), НСМО+1 ((a)LUMO+1). Симметрия чередующихся π -орбиталей меняется с четной (g) на нечетную (u) [Ghosh и др., 2008]. Б — схема электронных конфигураций, описывающих низшие возбужденные электронные состояния линейных полиенов [Kohler, 1991].

1.1.2.1 Кинетика низших возбужденных электронных состояний каротиноидов

Продолжительность жизни возбужденных состояний каротиноидов зависит от длины сопряженной системы, химических заместителей цепи и локального молекулярного окружения. Продолжительность жизни S2 в случае бета-каротина в н-бутане составляет 200 фс, а S1 10 ps (Frank, 2001). Отношение продолжительности жизни состояний S2 и S1 сохраняется практически для всех каротиноидов, S2 — короткоживущее состояние (50-300 фс), время жизни S1 на 2-3 порядка больше (1-20 пс) [Polívka, Sundström, 2004].

Развитие методов спектроскопии с высоким временным разрешением позволило определить дополнительные электронные состояния каротиноидов, которые образуются в результате фотовозбуждения. Спектроскопия возбужденного электронного состояния (*Excited State Absorbtion, ESA*) позволяет оценить скорости переходов между образующимися в результате возбуждения состояниями (Рис. 1.6 А). Метод основывается на возможности «накачки» возбужденного состояния с помощью короткой насыщающей вспышки монохроматического света (Pump) и сканирования спектрального поглощения с контролируемой временной задержкой (Probe) [Yan, Mukamel, 1990]. Сразу после поглощения кванта свет линия перехода $S_0 \rightarrow S_2$ «обесцвечивается», этот процесс носит название «выцветание основного состояния» (Ground State Bleaching, GSB). Вместе с тем появляются дополнительные линии, которые соответствуют поглощению образующихся в ходе возбуждения электронных состояний S2 и S1 ($S_1 \rightarrow S_n$, $S_2 \rightarrow S_n$ и $S_1 \rightarrow S_2$) [Niedziedzki и др., 2015]. Для того чтобы различить спектральные линии, образующиеся в ходе электронного возбуждения, проводят анализ скоростей изменения поглощения на различных длинах волн (Рис. 1.6 Б). Вне зависимости от схемы эволюции электронного возбуждения скорость дезактивации любого состояния ведет себя моно-экспоненциально. Это, например, означает, что дезактивация линий, связанных с поглощением состояния S1 ($S_1 \rightarrow S_n$ и $S_1 \rightarrow S_2$) будет обладать одним характеристическим временем вне зависимости от того, как образуется состояние S1. На основании подобного анализа были обнаружены дополнительные возбужденные состояния каротиноидов S* [Polívka, Sundström, 2009] и ICT [Enriquez и др., 2010; Hashimoto и др., 2018].

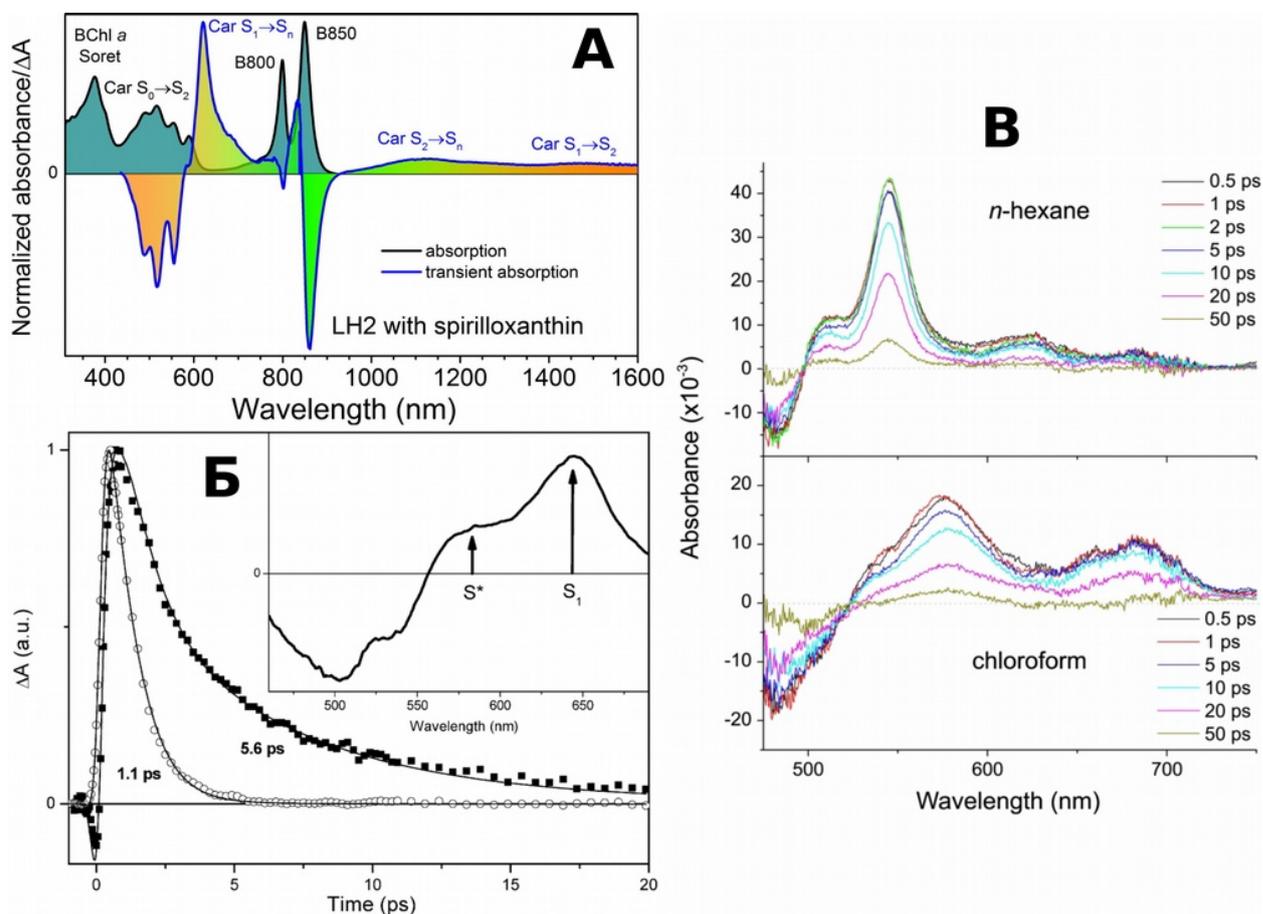


Рисунок 1.6. А — стационарный спектр поглощения светособирающего комплекса ЛНСII (черная линия) и разностный спектр поглощения из возбужденного состояния (ESA) (синяя линия). В спектре стационарного поглощения видны линии, относящиеся к хлорофиллу (BChl a Soret, B800, B850) и к каротиноиду (Car $S_0 \rightarrow S_2$). После возбуждения каротиноида светом поглощение в области перехода $S_0 \rightarrow S_2$ уменьшается, что говорит об обеднении заселенности состояния S_0 . Вместе с этим появляется дополнительное поглощение в области 600-800 нм, которое относят к поглощению каротиноида в состоянии S_1 и переходу $S_1 \rightarrow S_n$. В инфракрасной области появляются линии поглощения переходов $S_2 \rightarrow S_n$ и $S_1 \rightarrow S_2$ [Niedzwiedzki и др., 2015]. Б — кинетика изменения поглощения из возбужденного состояния родоксантина на длинах волн 571 нм (черные квадраты) и 642 нм (белые круги). Вставка показывает разностный спектр поглощения из возбужденного состояния через 1 пс после возбуждения молекулы светом. На спектре отмечено 2 области, отнесенные к состоянию S_1 и S^* , разделить которые можно при анализе кинетик на соответствующих длинах волн [Polívka, Sundström, 2009]. В — разностный спектр поглощения из возбужденного состояния 9-апокаротенала в неполярном (n-гексан, сверху) и полярном (хлороформ, снизу) растворителях. В полярном растворителе появляется характерный сигнал в длинноволновой области, который отнесен электронному состоянию ICT [Lee, Lee, 2014].

Состояние S^* обнаруживается на коротковолновом плече линии $S_1 \rightarrow S_n$ (Рис. 1.6 Б) [Balevičius Jr и др., 2019]. Единого мнения по поводу природы этого состояния на данный момент не сформировано. S^* может быть как колебательно-возбужденным состоянием S_1 («горячее» S_1 , hot S_1) [Konold и др., 2019] так и колебательно-возбужденным основным состоянием S_0 [Kuznetsova и др., 2019]

Состояние ICT (Intermolecular Charge Transfer, состояние с внутримолекулярным переносом заряда) является характерным для кето-каротиноидов и обнаруживается как отдельная полоса в спектре ESA только в полярных растворителях [Frank и др., 2000; Zigmantas и др., 2002]. ICT ярко проявляется у асимметричных кето-каротиноидов, которые содержат кетогруппу только с одной стороны [Enriquez и др., 2010]. Интенсивность поглощения состояния ICT может быть значительно увеличена благодаря связи кето-каротиноида с белком [Berera и др., 2013]

Ситуацию дополнительно усложняет то, что способ возбуждения молекулы каротиноида влияет на кинетику релаксации, что указывает на мультистационарную природу возбужденных электронных конфигураций [Kosumi и др., 2010; Staleva и др., 2015]

В заключение необходимо отметить, что описанный способ изучения кинетики стационарных возбужденных состояний каротиноидов допускает рассмотрение альтернативных схем эволюции электронного возбуждения для описания одного набора экспериментальных данных (Рис. 1.7).

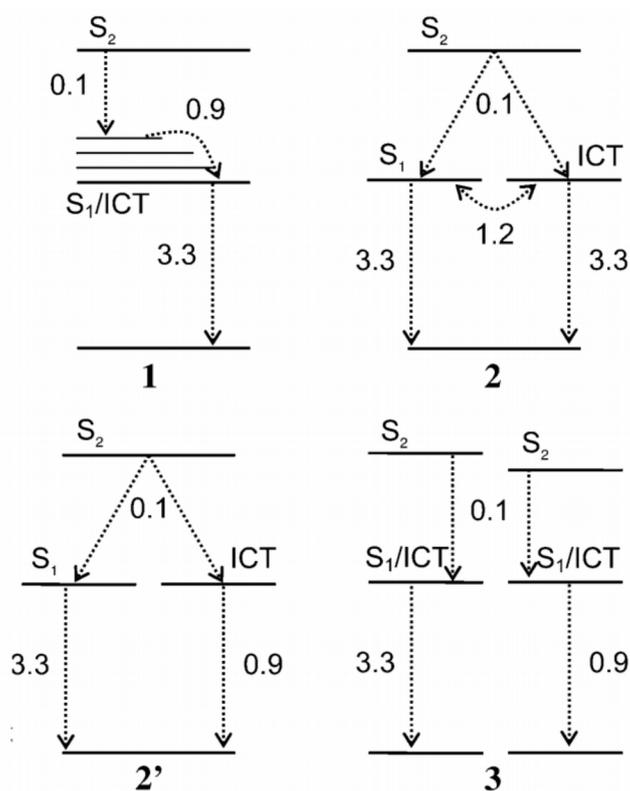


Рисунок 1.7. Альтернативные схемы эволюции электронного возбуждения молекулы эхиненона [Polívka и др., 2005].

1.1.2.2 Влияние локального окружения и конформации на спектральные свойства каротиноидов

В растворителях с большей поляризуемостью спектр каротиноидов претерпевает гипохромный сдвиг (Таблица 1.1). При этом время жизни состояния S2 изменяется по-разному для каротиноидов различной структуры (например: практически не меняется для сфероидена и сфероиденона, 8 и 6 пс, и сильно меняется для перидинина от 170 пс в н-гексане до 10 пс в метаноле) [Andersson и др., 1991; Frank и др., 2000]

Таблица 1.1. Влияние растворителя на положение оптического спектра каротиноидов.

Каротиноид	Метанол	Этанол	Ацетон	DMSO	Ацетонитрил	Хлороформ
β-каротин	22 220 [i]	22 120 [ii]	22 032 [ii]	-	22 060 [ii]	21 645 [i]
кантаксантин	-	-	21 739 [i]	-	21 739 [i]	21 276 [i]
эхиненон	-	-	21 929 [i]	-	-	21 141 [i]
Астаксантин	21 000 [i, iii]	20 877 [i]	20 919 [i]	20273 [i]	21 000 [i]	20 325 [i]

[i] - [Korczynski и др., 2005]

[ii] - [Renge, Grondelle van, Dekker, 1996]

[iii] - [Plagan и др., 2005]

Конформация каротиноида сильно влияет на расположение низших возбужденных электронных состояний. Было показано, что небольшие изменения BLA приводят к снижению относительной энергии состояний S1 и S2 на 0.3 эВ [Dreuw, 2006]. Самое сильное влияние на положение оптической линии поглощения оказывает протонирование каротиноида, которое ведет к драматическому батохромному сдвигу. Спектр поглощения каротиноидов также чувствителен к процессам агрегации, которые приводят к уширению спектра поглощения [Hempel и др., 2016; Köhn и др., 2008].

1.1.3 Протонированные формы каротиноидов

К катионным формам каротиноидов относятся такие производные как:

катионы оксония, карбокатионы, катионные молекулярные комплексы и катионные радикалы. Катионные формы каротиноидов мало стабильны и характеризуются оптическим

спектром, сильно сдвинутым в длинноволновую область (Рис. 1.8 F, G).

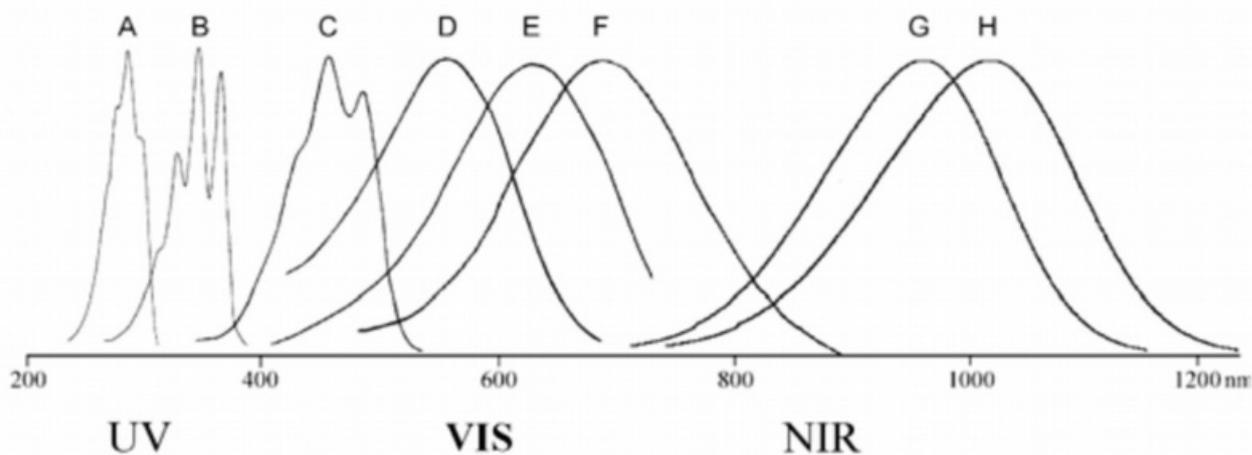


Рисунок 1.8. Разнообразие спектров поглощения каротиноидов: (А) фитоин; (В) фитофлюен; (С) β -каротин; (D) виолеритрин; (Е) крустацианин; (F) фукоксантин ион оксония; (G) β -каротин дикатион; (H) β -каротин-иодид.

Современный этап исследования «кислых» продуктов каротиноидов начинается с работ Вассерманна [Wassermann, 1954], который экспериментально определил константу кислотности и характер батохромного сдвига ряда полиенов и каротиноидов. Классическим механизмом образования нерадикальных положительно заряженных форм каротиноидов является протонирование в присутствии сильных кислот Бренстеда. Каротиноиды содержащие эпоксидную группировку протонируются с образованием катиона оксония, положительный заряд при этом локализуется на атоме кислорода. При добавлении щелочей (например KOH) катион оксония переходит в желтую хемикетальную форму, что является качественной реакцией на эпокси-каротиноиды.

Дополнительный интерес к протонированным формам каротиноидов связан с белком ракообразных крустацианином [Cheesman и др., 1966]. В своем составе он содержит кето-каротиноид астаксантин, но при этом спектр поглощения крустацианина находится в красной области спектра (Рис. 1.8 E). В настоящий момент необычный спектр крустацианина прочно связывают с образованием протонированной формы астаксантина в составе этого белка [Britton и др., 1997]

Теоретический расчет (в рамках полуэмпирических методов AM1, PM3) структуры протонированных кето-каротиноидов позволил оценить химические сдвиги сигнала ЯМР C^{13} -меченных кето-каротиноидов [Weesie и др., 1997]. На основании проведенных расчетов была сделана интерпретация спектров ЯМР C^{13} -меченного астаксантина в составе крустацианина, что и дало основание считать кето-протонированную форму каротиноида ответственной за сдвиг полосы поглощения [Weesie и др., 1997]. Позже это предположение было подтверждено

структурными методами [Cianci и др., 2002; Gordon и др., 2001].

Работа [Konovalov, Kispert, 1999] посвящена систематическому исследованию свойств протонированных каротиноидов. В рамках методов вычислительной квантовой химии рассчитаны физико-химические (теплота образования, потенциалы вращения, парциальные заряды) и структурные (BLA) параметры. В качестве кето-каротиноидов выбран кантаксантин и 9-бета-апо-каротиналь. Показано, что кетогруппа наиболее «легко» протонируется и что в результате протонирования барьер вращения вдоль двойных связей значительно уменьшается.

В работе Kildahl-Andersen, Frode Lutnaes, & Liaaen-Jensen, 2004) в рамках метода ЯМР было исследовано формирование протонированных форм кантаксантина в кислотах Льюиса (BF₃) и Бренстеда (CF₃COOH, CF₃SO₃H). Показано образование разнообразных протонированных форм, в т.ч. монопротонированных C-5, C-7, енолизированной O-4, дипротонированной O-4,4“, трипротонированной O-4,4“,C-7. Показано, что положительный заряд в дипротонированном O-4,4“ CAN на 86% локализован на соответствующих карбонильных группах, остальные 14% делокализованы на полиеновой цепи в соотношении C-6/6“ (8%) > C-8/8“ (3%) > C-10/10“ (1.7) > C-12/12“ (0.9) > C-14/14“ (0.3) ~C-15/15“. В соответствии с полученными результатами проведена аналогия с батохромным сдвигом поглощения астаксантина (гидрокси-кето-ксантофилла) в составе белка альфа-крустацианина. Рассчитана энергия образования (heat of formation) протонированных по разным положениям кантаксантина, предлагается следующий ряд: C-7 < C-5 < C-11 < C-9 < O-4.

1.2 Белковые комплексы с каротиноидами

Комплексы белков и каротиноидов широко представлены в живой природе. Они играют важную роль в фотосинтетическом аппарате, обеспечивая структурную организацию пигментов, которая позволяет эффективно адаптироваться к меняющимся условиям освещения [Siefermann-Harms, 1987; Meneghin и др., 2018; Niedzwiedzki и др., 2016; Walla и др., 2002]; обеспечивают транспортировку каротиноидов, которые плохо растворимы в полярных средах [Bhosale и др., 2004; Clevidence, Bieri, 1993]; выступают в качестве светофильтров, антиоксидантов и красителей [Li, Vachali, Bernstein, 2010; Matthews и др., 2006; Milicua и др., 1991].

Стехиометрические комплексы каротиноидов и белков носят название каротенопротеины [Britton и др., 1982; Ke, 1971]. Каротиноиды обычно не связаны с белковым остовом ковалентно (ОСР, крустоцианан, светособирающие комплексы), а помещены в гидрофобный карман, расположение боковых остатков в котором определяет специфичность связывания конкретных каротиноидов, которые адаптируют конформацию внутри кармана. Структурные особенности пигмента, влияющие на характер его взаимодействия с остатками

белка, можно разделить на 4 группы [Britton, Helliwell, 2008]:

- Размер молекулы (в частности длина сопряженной цепи)
- Наличие и положение атомов кислорода
- Наличие, размер и структура боковой циклической группировки
- Наличие и положение боковых метильных заместителей

Число определенных каротенопротеинов, скорее всего, сильно увеличится, т. к. на данный момент не разработаны методы для прогнозирования возможности белка связывать каротиноиды на основании его первичной последовательности, и процедура определения сводится к выделению и очистке цветной фракции белков клетки с последующим определением первичной последовательности и структуры [Britton, Helliwell, 2008].

Крустацианины (Crustacyanin)

Наиболее изученными каротенопротеинами является семейство крустацианинов. Эти белки, специфически связывающие каротиноид астаксантин, локализуются в панцире ракообразных (название от *греч. Crustacea* — ракообразное), и обуславливают характерное покраснение при термической обработке. Максимум поглощения астаксантина в неполярных растворителях находится на 460 нм, у альфа-крустацианина он смещен в длинноволновую область до 640 нм, у бета-крустацианина до 590 нм. Сравнение первичной последовательности различных крустацианинов выявляет их значительное родство между собой и с белками суперсемейства липокалинов, которые участвуют в связывании и транспортировке различных гидрофобных лигандов (типичным представителем липокалинов является ретинол-связывающий белок плазмы крови) [KEEN и др., 1991a; KEEN и др., 1991b]. Исследование современными структурными методами указывает на влияние протонирования кетогрупп астаксантина (донором протона выступает остаток гистидина) и перекрывания электронных плотностей близкого расположения молекул каротиноидов (аналога агрегации) в белковом кармане на спектральные свойства этого каротенопротеина [Chayen и др., 2003; Cianci и др., 2001].

Астериарубин (Asteriarubin)

Астериарубин — это фиолетовый каротенопротеин (максимум поглощения 555-570 нм) массой 43 кДа, который был выделен из дорсального эпителия морской звезды *Asterias rubens* [Bernhard и др., 1982; Elgsaeter, Tauber, Liaaen-Jensen, 1978; Shone, Britton, Goodwin, 1979]. В состав каротенопротеина входят астаксантин и ацетилированные производные 7,8-дидегидроастаксантин и 7,8,7',8'-тетрадегидроастаксантин. Анализ первичной последовательности астериарубина не выявил его родство с крустацианинами, как и с другими группами белков [Britton и др., 1982; Britton и др., 1997].

Аллопорин (Alloporin)

Аллопорин — каротенопротеин, выделенный из мягкого коралла *Allopora californica* (максимум поглощения 545 нм), специфически связывает астаксантин [Ronneberg и др., 1979].

Линкиацианин (Linckiacyanin)

Яркий голубой окрас морской звезды *Linckia laevigata* обеспечен каротенопротеином линкиацианином (максимум поглощения 395, 612 нм) [Clark и др., 1990; Zagalsky и др., 1989]. Линкиацианин связывает астаксантин и зеаксантин, а также «экзотический» каротиноид гидроксиклатриаксантин (*hydroxylathriaxanthin*).

Каротенопротеин западного каменного лобстера (The carotenoprotein of the Western Rock Lobster)

Хитиновый панцирь австралийского лобстера *Panulirus cygnus* содержит пигмент близкий по первичной последовательности и мультимерной организации к D-крустацианину, но отличающийся тем, что максимум его спектра поглощения (460 нм) практически соответствует таковому у свободного астаксантина [Wade и др., 2005]

Крустохрин (Crustochrin)

Крустохрин это астаксантин-содержащий пигмент желтого цвета, выделенный из лобстеров *Homarus gammarus* и *Homarus americanus* [Tlusty, Hyland, 2005; Young, Williams, 1983].

Ововердин (Ovooverdin)

Темно-зеленый пигмент ововердин является астаксанти-содержащим липогликопротеином, и может быть найден в яичниках и икре лобстеров [Zagalsky, 1985]. Спектр поглощения этого пигмента содержит две полосы на 460 и 640 нм, которые относят к астаксантину в различном микроокружении. Коротковолновая полоса отнесена к астаксантину, растворенному в липидной компоненте пигмента, длинноволновая к стехиометрическому сочетанию астаксантина и белка [Salares и др., 1979].

Оворубин (Ovorubin)

Оворубин — это пигмент, выделенный из речной улитки *Pomacea canaliculata*, представляющий крупный (330 кДа) астаксантин-содержащий гликопротеин [CHEESMAN, 1958]. Максимум спектра поглощения этого пигмента находится на 510 нм, но его интересной особенностью является ярко выраженная вибронная структура оптической линии, которая не характерна для астаксантина. Замещение астаксантина в составе пигмента каротиноидами, содержащими кетогруппу в положении С4, приводит к усилению вибронного характера спектральной линии, но замещение каротиноидами, содержащими только гидроксигруппу в положении С3, напротив, приводит к исчезновению вибронной структуры [Britton и др., 1982;

Clark, D'Urso, Zagalsky, 1980].

Велеллацианин (Velellacyanin)

Велеллацианин — это астаксантин-содержащий пигмент, выделенный из парусника *Veella veella*. Его спектральные свойства сходны с таковыми у краустацианинов, но структурной особенностью велеллацианина является его способность организовывать мультимерный суперкомплекс [Zagalsky, Jones, 1982].

1.2.1 Оранжевый каротиноидный белок (ОСР).

Оранжевый каротиноидный белок (*Orange Carotenoid Protein, OCP*) — это водорастворимый фото-рецептор, участвующий в процессе нефотохимического тушения (*Non-Photochemical Quenching, NPQ*) фотосинтетических светособирающих антенн цианобактерий (*Phycobilisomes, PBS*) [Wilson и др., 2010] [Wilson и др., 2008] [Wilson, 2006] [Kay Holt, Krogmann, 1981]. ОСР состоит из приблизительно одинаковых по размеру N- и C-доменов общей массой 35 кДа и содержит в качестве кофактора одну молекулу ксантофилла. Кофактор не связан с белком ковалентно и в его качестве могут выступать несколько различных каротиноидов, чаще всего это 3'-гидроксиэхиненон (3'-hydroxyl-echinenone, 3hECN), эхиненон (echinenone, ECN) или кантаксантин (canthaxanthin, CAN) [Kirilovsky, 2007; Kirilovsky, Kerfeld, 2016; Punginelli и др., 2009]. Биоинформатический анализ указывает на то, что ОСР является продуктом слияния двух примитивных каротиноид-связывающих белков [Бао и др., 2017; Lechno-Yossef и др., 2017]. Считается, что неактивная «оранжевая» форма белка ОСР^o (*OCP orange*) представляет из себя компактный белок, в котором оба домена связаны между собой. Форма ОСР^o не связывается с фикобилисомой и локализуется в цитозоле клетки. После поглощения кванта света ОСР может активироваться и перейти в «красную» форму ОСР^R, при переходе в которую, как считается, пропадают контакты между N- и C-доменами. Форма ОСР^R способна связаться с фикобилисомой и запустить NPQ. Одной молекулы ОСР-R достаточно, чтобы потушить одну фикобилисому (Gwizdala, Wilson, & Kirilovsky, 2011). Не связавшись с фикобилисомой, ОСР^R самопроизвольно дезактивируется и образуется ОСР^o. Процесс дезактивации катализирует белок *Fluorescence Recovery Protein (FRP)* [Boulay и др., 2010; Maksimov и др., 2017; Sutter и др., 2013](Рис. 1.9).

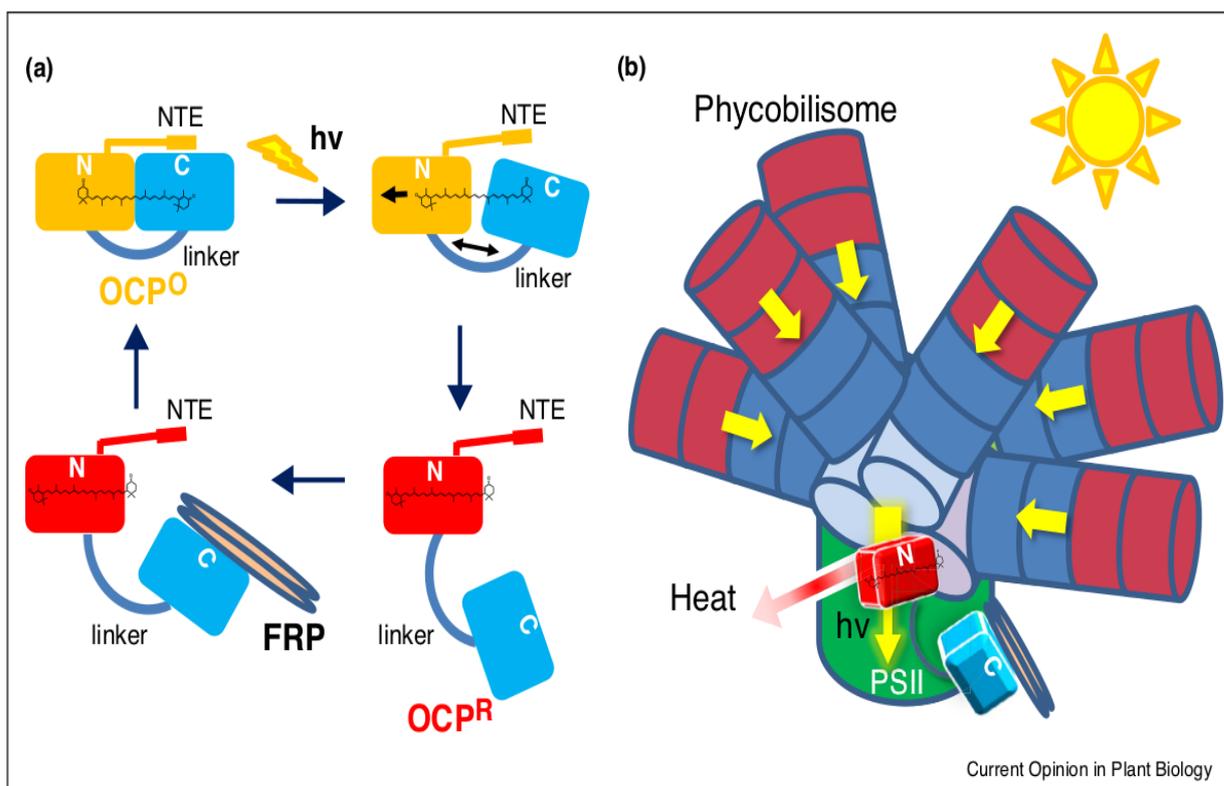


Рисунок 1.9. (a) — схема фотоцикла белка OCP. OCP^O — компактная неактивная форма, которая после поглощения кванта света переходит в активированную форму OCP^R. При этом пропадают контакты между N- (N) и C-доменами (C) белка, в т.ч. между N-концевой петлей (*N-Terminal Extention, NTE*) и C-доменом. Дезактивацию формы OCP^R катализирует белок FRP. (b) — схема фикобилисомы (Phycobilisome) с присоединенным комплексом OCP^R-FRP [Bao, Melnicki, Kerfeld, 2017].

Апо-форма (не содержащая молекулу кофактора) OCP способна связывать зеаксантин — ксантофилл, который не содержит карбонильную группу. При этом образуется оранжевая (зеа)холо-форма, которая по спектральным свойствам очень близка к холо-форме OCP^O дикого типа, но в отличие от последней резистентна к активирующему действию сине-зеленого света и не вызывает NPQ в системах *in vivo* [Punginelli и др., 2009].

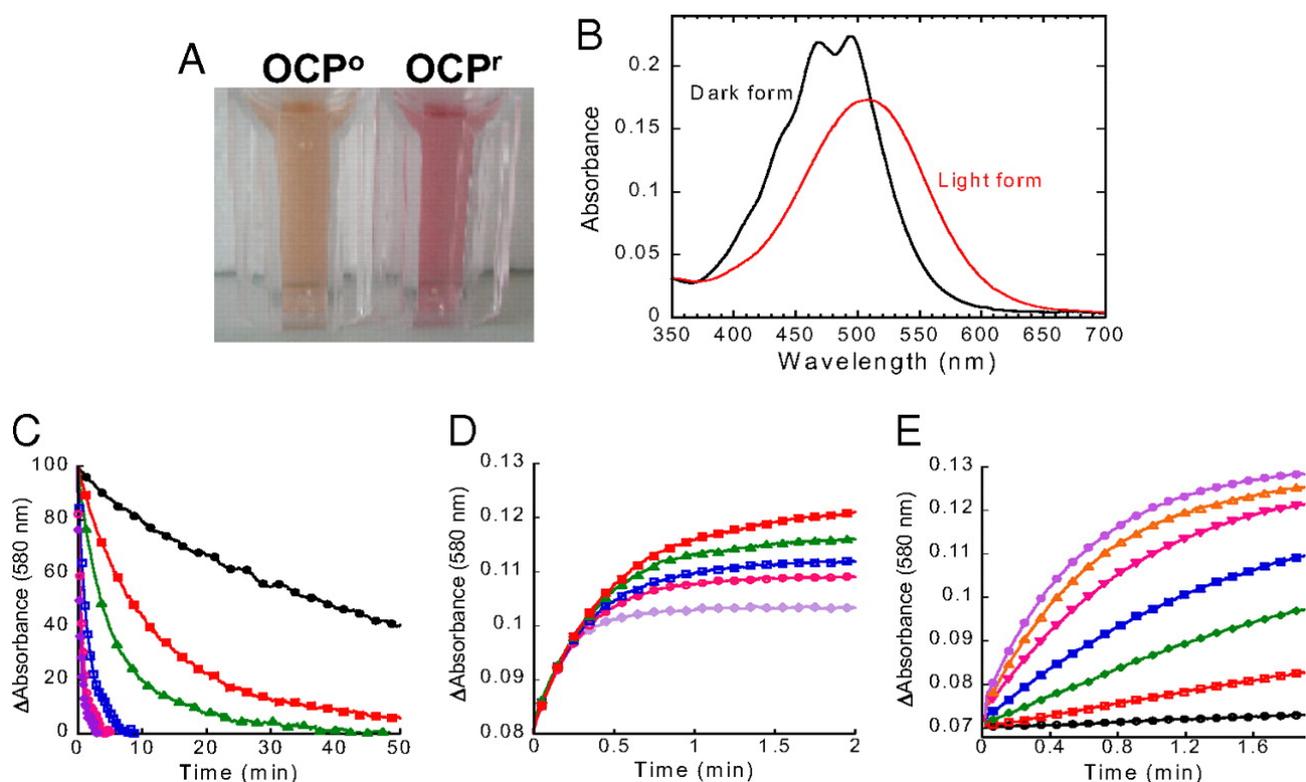


Рисунок 1.10. А — раствор неактивной формы ОСРо и активированной светом формы ОСРг. В — спектр поглощения неактивной формы ОСРо (черная линия) и активированной светом формы ОСРг (красная линия). С и D — кинетики перехода между формами ОСРо и ОСРг при температуре 32°C (фиолетовая), 28°C (розовая), 24°C (синяя), 19°C (зеленая), 15°C (красная) и 11°C (черная): С — кинетика дезактивации формы ОСРг с образованием ОСРо при отключении освещения; D — кинетика активации ОСРо с образованием ОСРг при облучении светом 495 нм интенсивностью 350 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Е — накопление формы ОСРг при 11°C (черная) и различной интенсивности освещения: 20 (черная), 50 (красная), 120 (зеленая), 210 (синяя), 350 (розовая), 740 (оранжевая), and 1,200 (фиолетовая) мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ [Wilson и др., 2008]

Показано, что процесс активации и перехода ОСРо в ОСРг имеет малый квантовый выход (0.3%) и сопровождается характерным смещением полосы оптического поглощения в красную область [Wilson и др., 2008]. В темноте активная форма ОСРг произвольно переходит в неактивную форму ОСРо. Кинетика процессов активации и дезактивации сильно зависит от температуры. Кинетика активации зависит от интенсивности облучения (Рис. 1.10). Кроме того, ОСР может быть активирован без света 1.5 М тиоционатом [King и др., 2014].

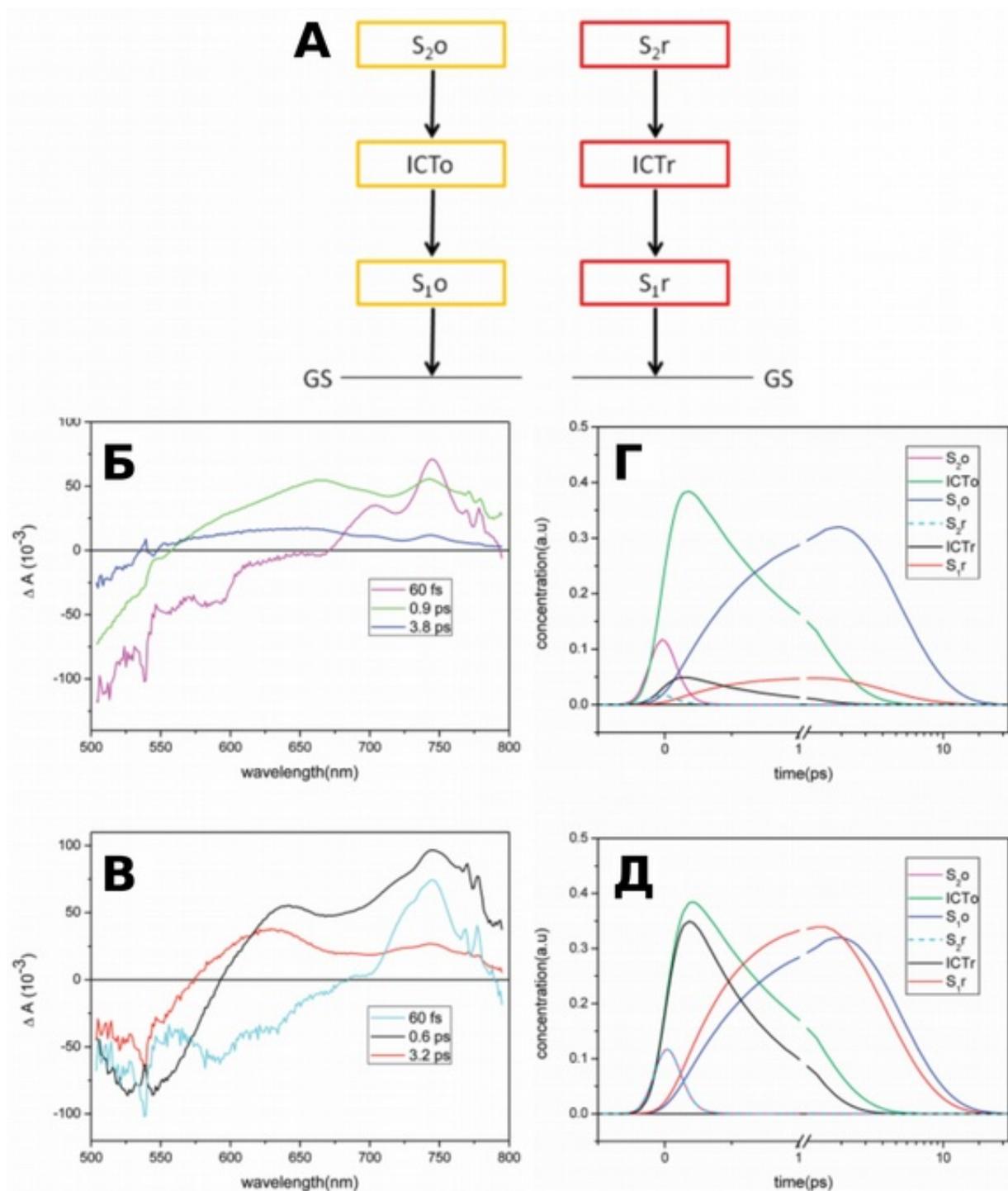


Рисунок 1.11. Кинетика эволюции электронного возбуждения ОСР. А — гипотетическая энергетическая диаграмма нижних возбужденных электронных состояний форм OCP^0 (желтая рамка) и OCP^R (красная рамка). Б и В — спектры характерных времен ESA спектра OCP^0 (Б) и OCP^R (В). Г и Д — кинетика заселенности нижних возбужденных электронных состояний OCP^0 (Г) и OCP^R (Д) [Verera и др., 2012].

Проведено сравнение спектра поглощения 3'-гидроксиэхиненона (3hECN) в различных растворителях и в составе ОСР. Максимум поглощения смещается в сторону

увеличения длины волны в ряду растворителей: н-гексан (450нм), метанол (455нм), сероуглерод (CS₂) (490нм). В свою очередь максимум поглощения ОСР₀ значительно смещен в красную область (495нм) и имеет хорошо разрешенную колебательную структуру, которая не характерна для циклических кето-каротиноидов (Т. Т. Polívka et al., 2005). Время жизни возбужденных состояний в различных молекулярных растворителях 3hECH составляет: ~230 фс для S₂ и около ~6 пс для S₁. Эти времена значительно сокращаются для 3hECH связанного с ОСР и равны <100 фс и ~3 пс для S₂ и S₁ соответственно [Polívka и др., 2005]. Спектр ESA ОСР также содержит ICT состояние, продолжительность жизни которого составляет <1 пс (Berera et al., 2012) (Рис. 1.11). Понижение температуры образца ОСР до 77° К, ввиду уменьшения вероятности термической релаксации, приводит к увеличению жизни возбужденных состояний до 340 фс, 7.5 пс и 2 пс для состояний S₂, S₁ и ICT соответственно [Berera и др., 2013].

Структурные данные об устройстве ОСР получены на основании результатов кристаллографии. К доступным кристаллическим структурам относятся:

- 3MG(N) — выделенный из ОСР *Synechocystis sp. PCC 6803*: 3MG1 — ОСР дикого типа (ОСР^{WT}); 3MG2 — точечная замена Y44W; 3mg3 — точечная замена R155L [Wilson и др., 2010];
- 5UI2 — выделенный из *Limnospira maxima* [Kerfeld и др., 2003];
- 5HGR — выделенный из *Anabaena (Nostoc) sp. PCC 7120* [López-Igual и др., 2016];
- 5TV0, 5TUW, 5TUX — варианты, выделенные из *Synechocystis sp. PCC 6803* substr. Kazusa (Bandara et al., 2017).

Перечисленные кристаллические структуры относятся к форме ОСР₀, кристаллизовать каротенопротеин в активированной форме ОСР₁ не удастся. Кристаллические структуры ОСР₀ указывают на несколько специфических межмолекулярных взаимодействий, обеспечивающих стабильность неактивной формы (Рис. 1.12). Кетогруппа (в том случае если она одна) каротиноида всегда располагается в С-доме белка. При этом боковой цикл в С-доме находится в транс-подобной конформации. Кетогруппа организует две водородные связи с аминокислотными остатками С-домена тирозина Y201 (нумерация соответствует структуре 3MG1) и триптофана W288. Аминокислоты выступают в качестве доноров водорода. В N-доме водородные связи не образуются, но возможно активное дисперсионное взаимодействие π-электронных плотностей каротиноида и остатков тирозина Y44 и триптофана W110. Междоменное взаимодействие представлено несколькими интерфейсами. Главный интерфейс взаимодействия доменов проходит в плоскости, перпендикулярной длинной оси белка, в центре этого и интерфейса находится соляной мостик между остатками аргинина R155 и

глутаминовой кислоты E244. Именно этот интерфейс определяет расположение каротиноид-содержащего кармана, который проходит через оба домена белка в направлении длинной оси. Второй интерфейс взаимодействия доменов представляет собой связь между N-концевой петлей (*N-Terminal Extention, NTE*) и внешней поверхностью С-домена. Оба домена связаны ковалентно линкерной последовательностью в 30 аминокислот, геометрия которой, ввиду отсутствия регулярной структуры, неизвестна.

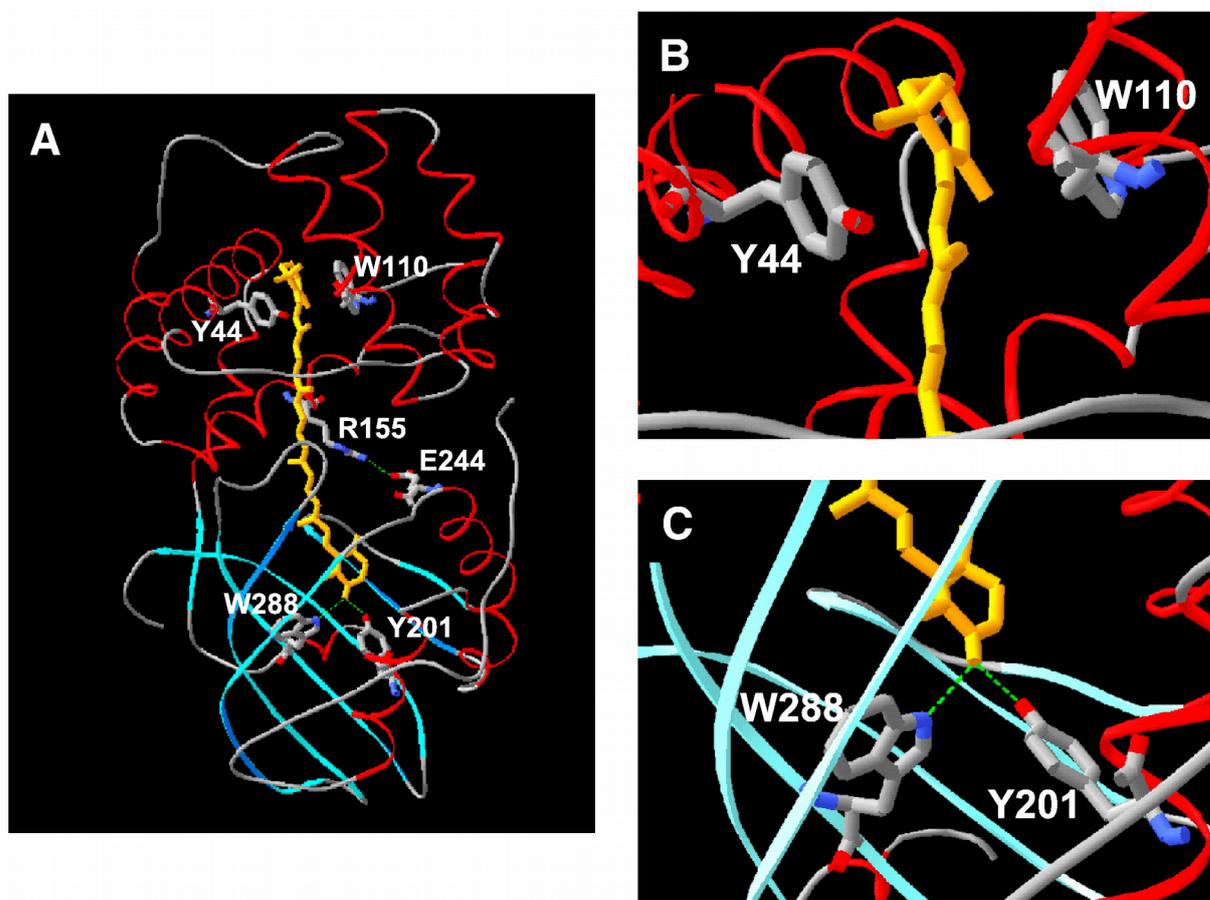


Рисунок 1.12. Кристаллическая структура OCP^O . А — общий план строения OCP^O , N-домен расположен сверху, С-домен снизу. В — боковой цикл каротиноида, расположенный в N-домене белка. С — боковой цикл, расположенный в С-домене белка, кетогруппа организует две водородные связи с остатками Y201 и W288 [Wilson и др., 2011]

Структурным аналогом активированной формы OCP^R принято считать каротенопротеин RCP (Red Carotenoid Protein) [Leverenz и др., 2015]. RCP представляет из себя N-домен OCP , при этом он, в отсутствие С-домена, способен связывать кето-каротиноиды, спектрально практически не отличим от OCP^R и вызывает NPQ при добавлении его к фикобилисомам. RCP кристаллизуется, что позволило разрешить его структуру: 4XB4 [Leverenz и др., 2015], 5FCX [Melnicki и др., 2016] (Рис. 1.13).

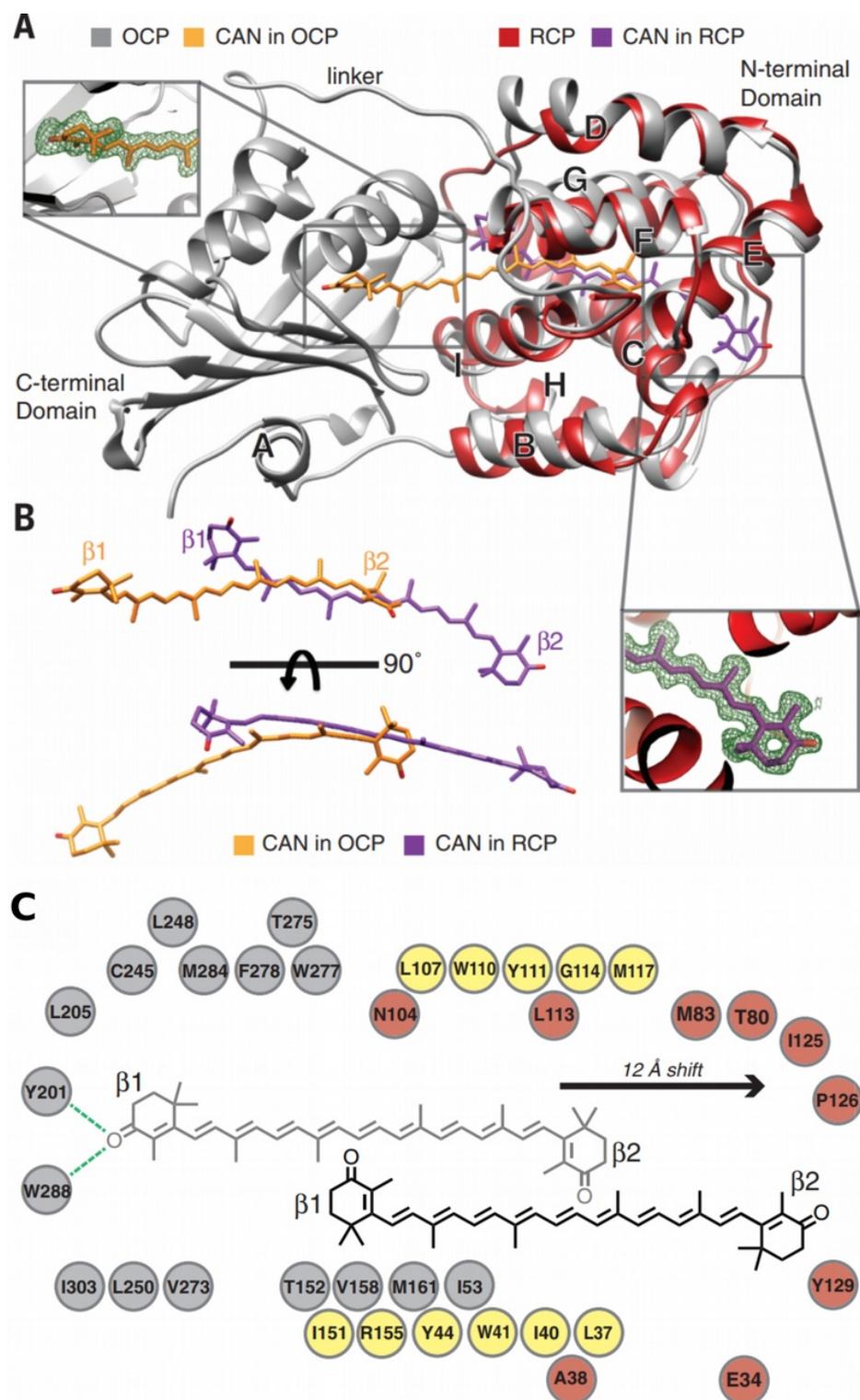


Рисунок 1.13. Сравнение структур OCP и RCP. А — сравнение кристаллических структур OCPo 3MG1 (серый белковый остов, оранжевый каротиноид) и RCP 4XB4 (красный белковый остов, фиолетовый каротиноид). В — сравнение кристаллических конформаций каротиноидов в OCPo 3MG1 (оранжевый) и RCP 4XB4 (фиолетовый). С — аминокислотные остатки, образующие каротиноид-связывающий карман только в OCPo 3MG1 (серые), только в RCP 4XB4 (красные) и в обеих формах белка (желтые).

Сравнение кристаллических структур OCP и RCP указывает на значительные конформационные изменения в ходе фотоактивации, при этом каротиноид транслоцируется на 12 Å относительно своего положения в кармане OCPo. При этом третичная структура N-домена меняется незначительно, спирали F и C немного расходятся, открывая дополнительный просвет, что позволяет каротиноиду сместиться. С этими представлениями согласуются результаты биохимических методов определения структурных различий между OCPo и OCPr, которые указывают на большое изменение в аминокислотных контактах междоменной области [Liu и др., 2016]. При этом внутримолекулярная организация остается практически неизменной [Zhang и др., 2016]. Результаты структурного анализа методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) также согласуются с гипотезой полной диссоциации N- и C-доменов [Gupta и др., 2015].

Анализ кристаллических структур OCP и RCP указывает на существование градиента электростатического потенциала, наведенного аминокислотными остатками (Рис. 1.14). Положительный полюс этого градиента расположен в C-домене белка (в окрестности водородных связей с тирозином и триптофаном) и отрицательный в N-домене [Bondanza и др., 2020; Otsuka, Mori, Takano, 2016]. Предполагается, что подобное распределение электростатического потенциала является причиной батохромного сдвига спектра поглощения каротиноида в составе OCP относительно каротиноида в растворителях.

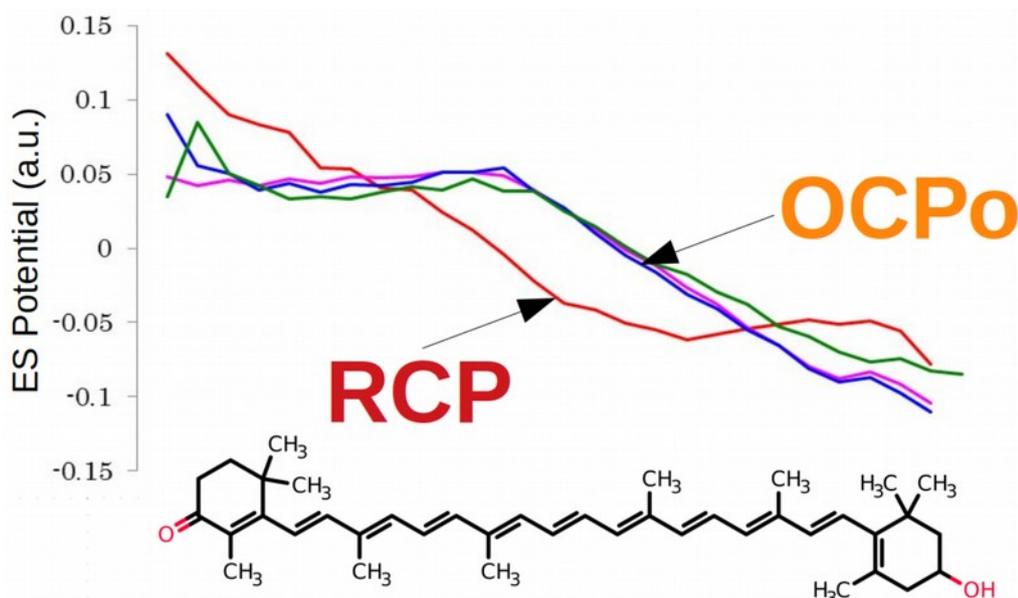


Рисунок 1.14. Распределение электростатического потенциала, наведенного белком на ядрах сопряженной цепи каротиноида в составе OCP и RCP [Otsuka, Mori, Takano, 2016].

Технология получения рекомбинантной холо-формы (содержащей молекулу каротиноида) OCP [Carbon De и др., 2015; Li и др., 2019; Maksimov и др., 2016] открыла дверь для систематического исследования свойств этого фоторецептора *in vitro*. На данный момент

получено и охарактеризовано более 10 мутантных форм ОСР (Таблица 1.2)

Считается, что спектр поглощения неактивированной формы ОСР (Рис. 1.10 Б черная линия) может быть разложен на две линии, которые относятся к двум формам ОСР₀ [Kerfeld и др., 2017]. Подобная гипотеза сильно затрудняет интерпретацию спектральных результатов, для которой становится необходим учет гетерогенности образца. В качестве дополнительного затруднения ОСР имеет склонность образовывать димеры. Димерная форма в экспериментах *in vitro* образуется при высоких концентрациях ОСР [Lu и др., 2017; Zhang и др., 2014], кроме того элементарная ячейка кристаллизованного белка представляет собой димер. На данный момент неизвестно имеет ли димерная форма физиологическую роль.

Таблица 1.2. Список охарактеризованных точечных мутаций ОСР.

Позиция замены	Замена	Фенотип	Источник
34	E → A	<40% NPQ, дезактивация ОСР ^R происходит быстрее	[Leverenz и др., 2015]
44	Y → F	Нет изменения фенотипа	[Wilson и др., 2010]
44	Y → S	Форма ОСР ^R не образуется	
84	C → A	<40% NPQ, дезактивация ОСР ^R происходит быстрее	[Leverenz и др., 2015]
110	W → F	Нет изменения фенотипа	[Wilson и др., 2010]
110	W → S	Не вызывает NPQ	[Wilson и др., 2010]
126-129	PAGY → VAGF	Форма ОСР ^R не образуется	[Leverenz и др., 2015]
126	P → V	<40% NPQ, дезактивация ОСР ^R происходит быстрее	
129	Y → F	<40% NPQ, дезактивация ОСР ^R происходит быстрее	
155	R → L	Не вызывает NPQ	[Wilson и др., 2010]

1.2.2 Фотоцикл ОСР

В ходе процесса активации можно различить ряд интермедиатов, образование которых начинается в пикосекундном (P1) и заканчивается в миллисекундном (OCP^R) диапазоне [Konold и др., 2019] (Рис. 1 15). Первый интермедиат P1 образуется в течение пикосекунд после поглощения кванта света и характеризуется исчезновением водородных связей между белковым остовом и каротиноидом. Следующие интермедиаты P2, P2', P3 образуются во временном диапазоне от десятков наносекунд до микросекунд и отвечают более масштабным изменениям отдельных структурных элементов ОСР, которые приводят к транслокации каротиноида внутри белковой глобулы и расхождению доменов белка. Фотоцикл лимитирует медленная дезактивация OCP^R.

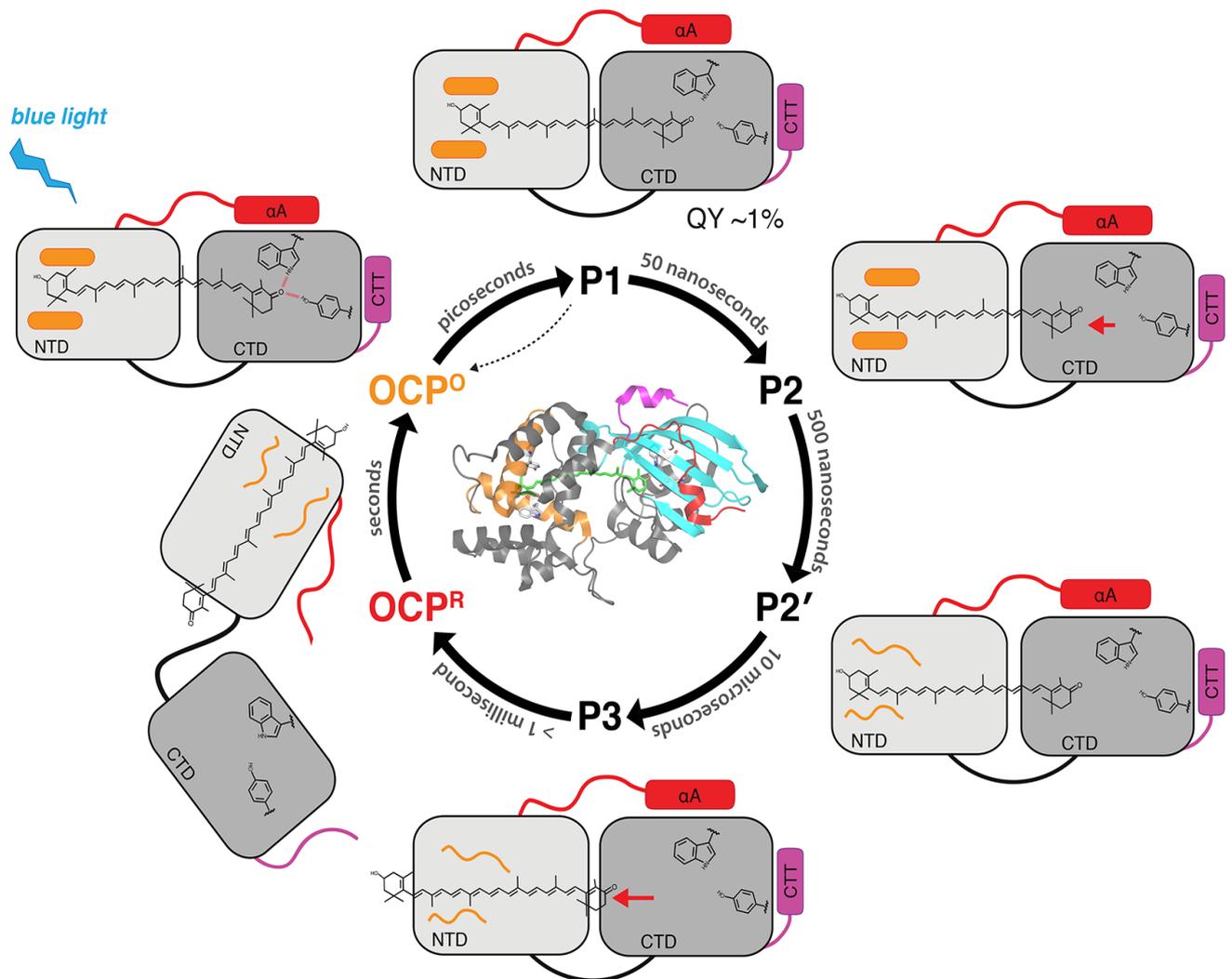


Рисунок 1.15. Гипотетическая схема фотоцикла ОСР [Konold и др., 2019]

1.2.3 Механизм фотоактивации ОСП

Анализ кинетик переходов между состояниями ОСП^o и ОСП^r привел к предположению о центральной роли цис-транс изомеризации пролина участков Gln224-Pro225 или Pro225-Pro226 в определении скорости перехода между состояниями [Gorbunov и др., 2011]

В отношении механизма фотодиссоциации водородных связей между остатками Y201/W288 и кетогруппой каротиноида сформулировано несколько предположений. Цис-транс изомеризация вокруг C6-C7 связи каротиноида рассматривалась в качестве основного механизма разрыва [Leverenz и др., 2015]. Эта гипотеза утратила свою актуальность, т. к. не была подтверждена спектральными методами изучения динамики ОСП в пикосекундном диапазоне [Konold и др., 2019]. Альтернативно рассматривается механизм кето-енольной таутомеризации каротиноида в составе ОСП [Bandara и др., 2017] (Рис. 1.16). Этот механизм также пока не имеет экспериментальных доказательств.

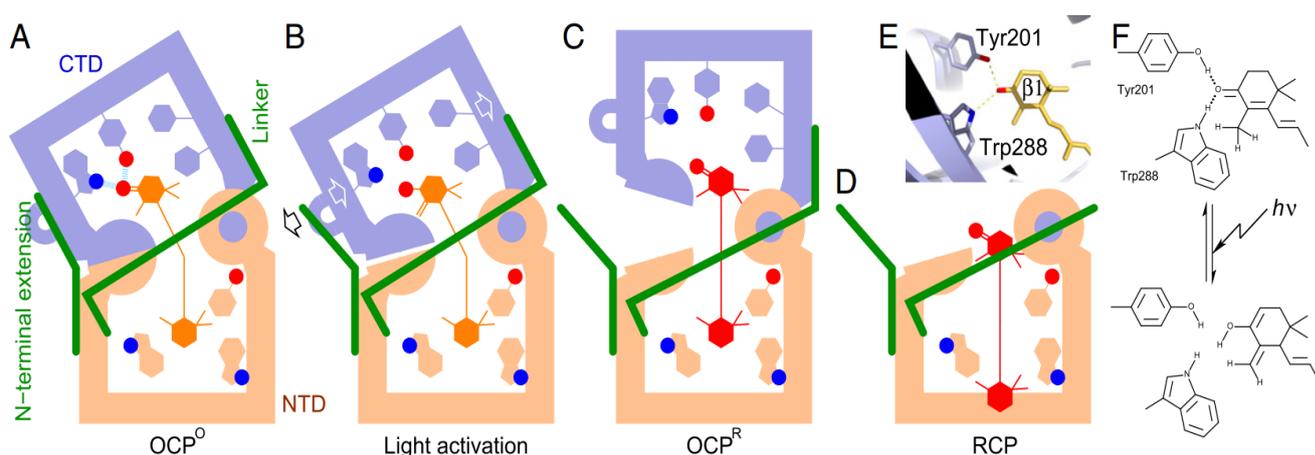


Рисунок 1.16. Схема структурных изменений ОСП в ходе фотоактивации. F — механизм кето-енольной фотодиссоциации водородных связей между остатками Y201/W288 и кетогруппой каротиноида

Глава 2. Методы исследования

Основным методом получения данных в этой работе является вычислительная квантовая химия. Методы вычислительной квантовой химии *ab initio* позволяют с высокой точностью рассчитывать свойства молекулярных систем. В основе квантовой теории лежат принцип неопределенности Гейзенберга [Busch, Heinonen, Lahti, 2007], принцип квантовой суперпозиции состояний [Kovachy и др., 2015] и принцип нелокальности [Popescu, Rohrlich, 1994]. Применительно к молекулярным системам, которые изучает квантовая химия, основополагающим также является принцип (запрета) Паули [Pauli, 1925]. В соответствие квантовой молекулярной системе ставится волновая функция $\Psi(x_i, t)$, которая в общем виде зависит как от пространственных координат x_i , так и от времени t . $\Psi(x_i, t)$ удовлетворяет перечисленным физическим принципам и содержит полную информацию о системе. Поиск волновой функции конкретной молекулярной системы основан на решении уравнения Шредингера, которое в стационарном виде может быть записано следующим образом:

$$\mathbf{H}(R_j)\psi(x_i)=E\psi(x_i)$$

Где \mathbf{H} — стационарный оператор Гамильтона; ψ — стационарная волновая функция квантовой системы; E — значение энергии квантовой системы; R_j — координаты ядерного остова молекулярной системы; x_i — координаты электронов молекулярной системы. Для фактического решения уравнения Шредингера используются численные методы, о которых подробнее написано в следующих разделах.

Оператор Гамильтона, являющийся суммой операторов кинетической и потенциальной энергии, определяет энергетические взаимодействия, учтенные для данной молекулярной системы. Атомные ядра молекулярной системы R_j в приближении Борна-Оппенгеймера считаются неподвижными [Combes, Duclos, Seiler, 1981], и их координаты параметрически включены в оператор Гамильтона. Решением уравнения Шредингера для основного состояния является волновая функция ψ_0 , при которой значение энергии E_0 минимально (вариационный принцип). Вариационный метод позволяет найти в предварительно заданном базисном пространстве решение ψ_0 [Epstein, 2012]. После того, как волновая функция для конкретного оператора Гамильтона найдена, возможно вычисление любых наблюдаемых величин, которые являются собственным значением действия соответствующего оператора на найденную волновую функцию:

$$\mathbf{\Gamma}\psi=g\psi$$

Где $\mathbf{\Gamma}$ — оператор физической наблюдаемой; ψ — найденная волновая функция

квантовой системы; g — значение физической наблюдаемой.

Таким образом вычисляется, например, градиент потенциальной энергии на атомных ядрах (определяющийся суммой сил отталкивания ядер друг от друга и сил притяжения ядер и электронов), что позволяет осуществить процедуру оптимизации геометрии молекулярной системы. Для этого сначала строится стартовая геометрия ядерного остова, которая параметрически определяет оператор Гамильтона, решается уравнение Шредингера, находится волновая функция, вычисляются компоненты градиента потенциальной энергии $\mathbf{v}_j(v_{jx}, v_{jy}, v_{jz})$ на атомных ядрах системы. Координаты ядерного остова смещаются вдоль вычисленных векторов \mathbf{v}_j , рассчитываются новые координаты атомных ядер R_j , которые в качестве параметров переопределяют оператор Гамильтона, и процедура повторяется сначала. Такой итеративный подход позволяет найти локальный минимум потенциальной энергии, в котором градиенты на атомных ядрах становятся эффективно равны нулю, а молекулярная система отвечает минимуму потенциальной энергии [Pulay, Fogarasi, 1992; Schlegel, 1982].

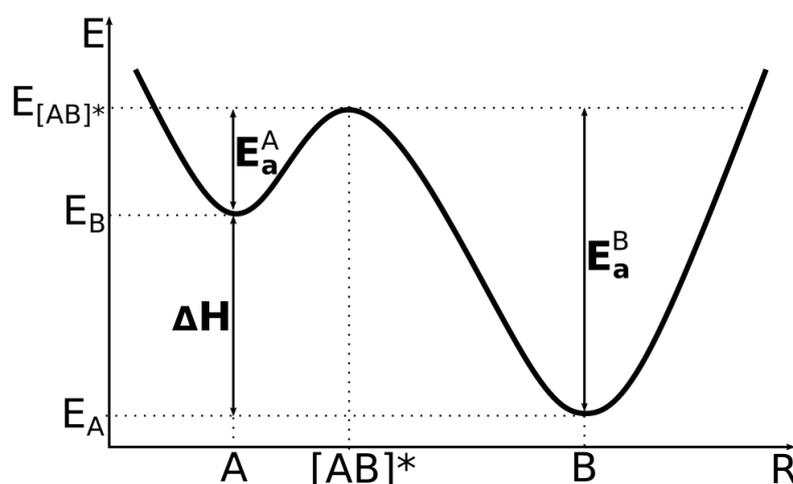


Рисунок 2.1. Поверхность потенциальной энергии мультисостояционной молекулярной системы. На графике изображена зависимость потенциальной энергии E от координаты R . Два локальных минимума A и B отвечают двум состояниям системы. Локальный максимум отвечает энергии переходного состояния $[AB]^*$. ΔH - энтальпия перехода из состояния A в B . E_a^A и E_a^B - энергия активации прямого и обратного переходов соответственно.

Этот подход очень удобен для описания мультисостояционных молекулярных систем (Рис. 2.1). Процедура оптимизации позволяет вычислить волновые функции и энергии состояний A и B , отвечающие локальным минимумам потенциальной энергии. Разница между энергией этих состояний определяет энтальпию процесса перехода состояния A в состояние B . Без учета энтропии в такой системе может быть вычислена константа равновесия между

состояниями: $K = \frac{[A]}{[B]} = e^{-\frac{\Delta H}{RT}}$. Энергия переходного состояния $[AB]^*$ определяет активационные барьеры прямого E_a^A и обратного E_a^B переходов, которые, в свою очередь, определяют зависимость скоростей реакции от температуры. Описанный теоретический подход позволяет связать экспериментальные физические наблюдаемые ($\Delta H, E_a^A, E_a^B$) со структурными изменениями молекулярной системы (координатой R) в ходе химических превращений.

2.1 Вид волновой функции и базисное пространство для поиска волновой функции

Общего аналитического решения уравнения Шредингера для многоэлектронной системы не существует. Поэтому приходится пользоваться численными методами, которые позволяют подобрать приближенную волновую функцию для заданной системы. Многоэлектронная волновая функция $\psi(x_1, x_2)$ записывается в виде определителя Слэтера [Foldy, 1962] – антисимметричного относительно электронных перестановок представления через одноэлектронные функции $\varphi_1(x_i), \varphi_2(x_i)$:

$$\psi(x_1, x_2) = \begin{vmatrix} \varphi_1(x_1) & \varphi_2(x_1) \\ \varphi_2(x_1) & \varphi_2(x_2) \end{vmatrix}$$

Одноэлектронные элементы определителя Слэтера $\varphi_i(x_i)$ выражаются при помощи математического конструкта – молекулярных орбиталей (МО), которые описывают распределение делокализованной электронной плотности системы [Hehre, 1976]. МО выражается в качестве вектора в базисном пространстве, образованном специально подобранными функциями v_j :

$$\varphi_i(x_1) = \sum_j c_j v_j(x_i)$$

Базисы, использованные в этой работе, представляют из себя конечные наборы функций атомных орбиталей (АО), центрированных на атомных ядрах молекулярной системы. Такой подход носит название молекулярная орбиталь – линейная комбинация атомных орбиталей (МО ЛКАО) [Snow, Bills, 1975]. В настоящее время доступно огромное число альтернативных базисных наборов атомных орбиталей, в этой работе использованы следующие:

- 6-311++G** [Ditchfield, Hehre, Pople, 1971; Hehre, Ditchfield, Pople, 1972];
- def2-SVP и def2-TZVPP [Kendall, Dunning, Harrison, 1992];
- SBKJC+* с псевдопотенциалом SBKJC [Labello, Ferreira, Kurtz, 2006; Labello, Ferreira, Tcurtz, 2005]

2.1.1 Метод BSSE

Оценка энергии взаимодействия между двумя молекулами А и В может быть проведена с помощью сравнения энергии, соответствующей комплексу E(AB), с суммой энергий его отдельных частей E(A) и E(B). При этом, для того чтобы избежать артефакта смены базисного пространства, необходимо вычислить все три волновые функции (ψ_{AB} , ψ_A , ψ_B) в едином базисе, который содержит АО как А, так и В (молекула А рассчитывается в базисном наборе, содержащем АО В, а В – в базисном наборе, содержащем АО А). Такой подход, носящий название BSSE (*Basis Set Superposition Error*) [Gutowski, Chalasinski, 1993], применяется в этой работе для расчета энергии взаимодействия в молекулярных комплексах.

2.2 Метод самосогласованного поля (ССП)

Уравнение Шредингера не имеет аналитического решения для многоэлектронной молекулы. Решение численными методами сводится к поиску коэффициентов разложения МО $\varphi_i(x_i)$ по базисному набору c_j таким образом, чтобы многоэлектронная волновая функция ψ удовлетворяла вариационному принципу. Поиск такой функции начинается с формулировки пробной волновой функции ψ_{trial} , коэффициенты разложения по базисному набору которой подбираются на основании различных эмпирических схем [Lee и др., 2015; Shao и др., 2006]

В рамках теории функционала для оптимизации (поиска наименьшего по энергии решения) ψ_{trial} по параметрам c_j необходимо решить систему зацепляющихся уравнений, названную вековой:

$$\sum_j c_j (H_{jk} - \epsilon S_{jk}) = 0 \quad (1)$$

$$\det |H_{jk} - \epsilon S_{jk}| = 0 \quad (2)$$

, где $H_{jk} = \int \psi_j H \psi_k$ и $S_{jk} = \int \psi_j \psi_k$

Оптимизация происходит итеративно: сначала на основании выбранной ψ_{trial} вычисляются значения H_{jk} и S_{jk} , далее решается уравнение (2) относительно ϵ , решение подставляется в (1). Решением уравнения (1) являются уточненные значения c_j , которые используются для вычисления новых H_{jk} и S_{jk} и процедура повторяется. При правильно выбранном базисном наборе и ψ_{trial} последовательное вычисление c_j приводит к уменьшению ϵ , которое приближается к своему минимальному значению в данном функционале. Как только разность между энергиями ϵ двух итераций ниже выбранного порогового значения (предела сходимости), процедура самосогласования считается оконченной. Считается, что наименьшая ϵ

– энергия основного состояния, а соответствующая ей волновая функция оптимизирована.

Для решения задачи поиска молекулярной волновой функции разработано несколько подходов.

2.2.1 Метод Хартри-Фока-Рутаана

Метод Хатри-Фока-Рутаана (ХФР) является классическим способом решения много-электронного уравнения Шредингера. Метод основан на “среднепольном приближении”, в рамках которого взаимодействие электронов (многоэлектронная задача) заменяется на взаимодействие одного электрона с усреднённым полем, созданным всеми остальными электронами (одноэлектронная задача). При этом M -электронное уравнение Шредингера трансформируются в M одноэлектронных уравнения Хартри-Фока:

$$f_1 \phi_i(1) = \varepsilon_i \phi_i(1)$$

, где f_1 - одноэлектронный оператор Фока:

$$f_1 = h_1 + \sum_{j=1}^{N/2} [2J_u(1) - K_u(1)]$$

, где h_i – оператор кинетической энергии и взаимодействия с неподвижными ядрами i -ого электрона, J_u - оператор кулоновского взаимодействия электронов и K_u – оператор обменного взаимодействия электронов. Операторы J_u и K_u определены следующим образом:

$$J_u(1) \phi_i(1) = \phi_i(1) \int \frac{|\phi_j(2)|^2}{r_{12}} dr_2$$

$$K_u(1) \phi_i(1) = \phi_j(1) \int \frac{\phi_j(2) \phi_i(2)}{r_{12}} dr_2$$

Метод Хартри-Фока-Рутаана является вариантом решения задачи Хартри-Фока в которой решения ищутся в рамках МО ЛКАО. На основании уравнения Хартри-Фока записывается соответствующая вековая система и производится процедура самосогласования для поиска коэффициентов c_{ja} разложения по базисному набору функции ϕ_a .

2.2.2 Учет конфигурационного взаимодействия

Во многих случаях метод ХФР позволяет корректно описать основное состояние молекулярной системы, но он непригоден для описания возбужденных электронных состояний. Замена в гамильтониане взаимодействия между электронами на взаимодействие электрона с усреднённым полем не позволяет корректно описать перераспределения электронной плотности в ходе возбуждения. Разность между истинной энергией возбужденного состояния и энергией, полученной методом ХФ, называют энергией электронной корреляции. Появление этой поправки отвечает изменению электронных плотностей взаимодействующих электронов.

Использование подхода конфигурационного взаимодействия (КВ) позволяет сильно уточнить энергии возбужденных электронных состояний, что необходимо при расчете спектральных характеристик системы. Этот метод является уточнением метода ХФ и за основу берет волновые функции и энергии, найденные ранее методом ХФ. Волновая функция в методе КВ выглядит так:

$$\Psi_S = \sum_{j=1}^L C_{jS} \Phi_j \quad \text{где } \Phi_j \text{ – слэттеровский определитель } j\text{-ого состояния, а } L \text{ – число}$$

учитываемых конфигурационных функций состояний. Состояние Φ_1 соответствует основному состоянию системы, а остальные – возбужденным конфигурационным функциям. Конфигурационные функции, полученные однократной перестановкой электронов с занятых в основном состоянии уровней на вакантные, называются однократно возбужденными. По аналогии существуют многократно возбужденные конфигурационные функции состояний. В рамках вариационного метода происходит поиск коэффициентов C_{jS} , отвечающих оптимизации энергии соответствующих волновых функций Ψ_S .

Открытым остается выбор конфигурационных состояний Φ_j , которые будут учтены методом КВ. Пространство учтенных конфигураций называется активным пространством. Оно включает в себя электроны (с заселенными ими уровнями), способные к созданию возбужденной конфигурации – активные электроны, и энергетические уровни (не заселенные), на которые возможно возбуждение – активные уровни. При этом размерность задачи (число учтенных конфигураций) резко растет при расширении активного пространства. Адекватный выбор активного пространства – немаловажный вопрос, и подбор его параметров для расчета каротиноидов приведен в этой работе.

При более строгом рассмотрении коэффициенты C_{jS} в методе КВ сами должны зависеть от коэффициентов c_{ji} в разложении МО ЛКАО. Решая систему взаимозацепляющихся уравнений Рутаана (зная энергии уровней КВ), возможно уточнить коэффициенты молекулярных орбиталей и провести улучшенный расчет. Решение такой системы носит название метода многоконфигурационных взаимодействий (МКВ).

В работе для расчета энергии состояния S1 каротиноидов использован метод из группы МКВ ХМСQDPT2 [Granovsky, 2011]. Активное пространство в расчетах варьировалось. Для расчета состояния S1 ряда свободных каротинов и ксантофиллов, проведенного в 2015 году [Yaroshevich, Krasilnikov, Rubin, 2015], число активных электронов равнялось числу атомов в сопряженной цепи молекулы (22 для β -каротина), а число активных вакантных орбиталей составляло 6-8, усреднение проводилось по 8 состояниям – решениям КВ. В расчетах влияния

образования водородных связей на энергию уровня S1 каротиноидов в активное пространство было включено 10 электронов и 10 орбиталей, усреднение проведено по пяти состояниям.

2.2.3 Теории Функционала Плотности (DFT)

В этой работе расчеты основного электронного состояния каротиноидов проведены с помощью теории функционала плотности (*Density Functional Theory, DFT*). Теория основана на работах Хоэнберга, Кона и Шема, которые доказывают однозначное соответствие между волновой функцией квантовой системы и распределением ее электронной плотности [Hohenberg, Kohn, 1964], а также предлагают вековую систему уравнений для оптимизации функции электронной плотности [Kohn, Sham, 1965; Sham, Kohn, 1966]. Такой подход позволяет значительно сократить затраты на вычисление волновой функции состояния квантовой системы. Основная идея Кона и Шема заключается в описании квантовой системы взаимодействующих частиц с помощью «вспомогательной» (*auxiliary*) системы не взаимодействующих частиц, двигающихся в локальном потенциале Кона-Шема (*Kohn-Sham, KS*) $v_{KS}(\mathbf{r})$. Таким образом, M-электронное уравнение Шредингера, подобно тому как это происходит в методе ХФ, можно переписать в виде M одноэлектронных уравнений KS:

$$\left[-\frac{1}{2}\Delta + v_{KS}(r)\right]\varphi_i(r) = \epsilon_i \varphi_i(r) \quad , \quad (3)$$

$$n(r) = \sum_{i=1}^N f_i |\varphi_i(r)|^2 \quad , \quad (4)$$

$$\sum_{i=1}^N f_i = M \quad ,$$

Где $\varphi_i(\mathbf{r})$ (спин-) орбитали KS, $n(\mathbf{r})$ — функция распределения электронной плотности основного состояния, N — число занятых орбиталей, M — полное число электронов системы. При такой формулировке задачи полная энергия системы является функционалом электронной плотности основного состояния системы:

$$E_{KS}[n] = E_{kin}[n] + E_{ext}[n] + E_H[n] + E_{XC}[n]$$

Тут $E_{ext}[n]$ представляет энергию взаимодействия электронной плотности и внешнего поля $v_{ext}(r)$, которое включает в себя как поле атомных ядер, так и любое внешнее электрическое поле:

$$E_{ext}[n] = \int n(r) v_{ext}(r) dr$$

Функционал $E_H[n]$ представляет энергию кулоновского взаимодействия:

$$E_{ext}[H] = \frac{1}{2} \int \int \frac{n(r)n(r')}{|r-r'|} dr dr'$$

$E_{ext}[n]$ и $E_H[n]$ являются так называемыми «явными» (*explicit*) функционалами

электронной плотности.

Функционал $E_{kin}[n]$ представляет кинетическую энергию и выражается в виде:

$$E_{kin}[n] = \sum_{i=1}^N f_i \int |\varphi_i|^2 - \frac{1}{2} \Delta |\varphi_i|^2 dr$$

$E_{XC}[n]$ – функционал обменной корреляции (*exchange-correlation, XC*), по определению должен учитывать всю энергию, не учтенную $E_{kin}[n]$, $E_{ext}[n]$ и $E_H[n]$ (в частности все неклассические электрон-электронные взаимодействия). $E_{XC}[n]$ является «неявным» (*implicit*) функционалом. Точный вид $E_{XC}[n]$ не известен, что делает необходимым подбор (аппроксимацию) этого функционала для частных систем. В настоящее время доступно огромное число альтернативных функционалов DFT, пригодных для расчета основного состояния сопряженных π -систем [Közdörf, Brédas, 2016]. В этой работе были использованы:

- B3LYP [Becke, 1988];
- CAM-B3LYP [Yanai, Tew, Handy, 2004];
- PBE0 [Adamo, Barone, 1999].

Потенциал KS $v_{KS}(r)$ из (3) может быть вычислен из функциональной производной по функции электронной плотности $n(\mathbf{r})$ соответствующих функционалов:

$$v_{KS}[n](r) = \frac{\partial}{\partial n(r)} (E_{ext}[n] + E_H[n] + E_{XC}[n]) = v_{ext}[n] + v_H[n] + v_{XC}[n]$$

Так же как и в методе ХФ решение уравнений KS находится благодаря итеративной процедуре ССП.

2.2.3.1 Учет дисперсионного взаимодействия D3

Для оценки энергии невалентных (дисперсионных) взаимодействий в работе использовано уточнение в рамках метода Гримма (Grimme) DFT-D3 [Grimme и др., 2010; Wagner, Schreiner, 2015]. Метод использует эмпирически подобранные параметры для учета двух- и трех-центровых взаимодействий между атомами молекулярной системы, при этом учитываются как $C6$ (взаимодействие, пропорциональное шестой степени расстояния между центрами) так и $C8$ (взаимодействие, пропорциональное восьмой степени расстояния между центрами) взаимодействия. Уточнение энергии системы осуществляется апостериори на основании рассчитанной функции состояния.

2.2.4 Теории Функционала Плотности, Зависящей от Времени (TDDFT)

Теория DFT, описанная в предыдущем разделе, позволяет оптимизировать только основное электронное состояние и не подходит для вычисления возбужденных электронных

состояний. Для вычисления возбужденных состояний необходимо ввести зависимость функции электронной плотности от времени $n(\mathbf{r}t)$. Теорема Рунге-Гросса [Runge, Gross, 1984] доказывает однозначное соответствие между зависящим от времени внешним потенциалом $v_{\text{ext}}(\mathbf{r}t)$ и зависящей от времени плотностью $n(\mathbf{r}t)$ для многоэлектронных систем, если известны начальные условия $n(\mathbf{r}t_0)$. Теорема Рунге-Гросса и вытекающая из нее теория функционала плотности, зависящей от времени (*Time-Dependent Density Functional Theory, TDDFT*), применяется для описания взаимодействия как с магнитным, так и с электрическим полем [Gross, Kohn, 1990; Marques, Gross, 2004]. В этой работе использован вариант TDDFT, касающийся оптического ответа (*optical response*) на слабое электрическое поле, который носит название теория линейного ответа (*linear response, LR*) [Petersilka, Gossmann, Gross, 1996]. LR TDDFT на данный момент стал одним из наиболее активно применяемых подходов для вычисления энергии возбуждения, силы осциллятора и геометрии возбужденных состояний π -сопряженных систем.

Уравнение KS с зависимостью от времени может быть записано следующим образом:

$$i\partial_t \epsilon_i \varphi = \left[-\frac{1}{2} \Delta + v_{\text{KS}}(\mathbf{r}, t) \right] \varphi_i(\mathbf{r}, t)_i(\mathbf{r}) \quad (5)$$

где зависящий от времени потенциал KS, аналогично описанной ранее процедуре DFT, может быть выражен через соответствующие функционалы:

$$v_{\text{KS}}[n](\mathbf{r}, t) = v_{\text{ext}}[n](\mathbf{r}, t) + v_{\text{H}}[n](\mathbf{r}, t) + v_{\text{XC}}[n](\mathbf{r}, t) \quad (6)$$

Для того чтобы выразить зависящий от времени функционал XC (точный вид которого не известен) применяется адиабатическое приближение, в рамках которого $v_{\text{XC}}[n](\mathbf{r}, t)$ полностью зависит от начальных условий $n(\mathbf{r}t_0)$. В таком приближении зависящий от времени функционал XC можно выразить через независящий от времени функционал:

$$v_{\text{XC}}[n](\mathbf{r}, t) = \frac{\delta E_{\text{XC}}[n(\mathbf{r}, t)]}{\delta n(\mathbf{r}, t)}$$

Решение уравнений TDDFT и поиск волновых функций возбужденных состояний происходит в рамках формализма Касиды (Casida) [Casida, 2005; Casida, Huix-Rotllant, 2012]. Для ускорения расчета возбужденных состояний применяется аппроксимация Тамма-Данкоффа (*Tamm-Dancoff Approximation, TDA*) [Hirata, Head-Gordon, 1999; Vaswani и др., 2003].

Большим недостатком адиабатического приближения, которое используется в настоящее время в большинстве методов TDDFT для выражения зависящего от времени функционала XC, является принципиальная невыразимость многократно возбужденных конфигураций [Maitra и др., 2004; Tozer, Handy, 2000]. Этот факт делает этот класс методов в отношении π -сопряженных систем пригодным только для описания оптически активного

состояния S_2 . В этой работе были использованы следующие функционалы TDDFT:

- TD-B3LYP [Kish и др., 2015];
- TD-CAM-B3LYP [Yanai, Tew, Handy, 2004];
- TD-wB97X [Chai, Head-Gordon, 2008];
- TD-wB2PLYP [Grimme, Neese, 2007].

2.3 Оценка энергии водородной связи в возбужденном состоянии

Основное внимание в работе уделено исследованию связи конформации каротиноидов и энергии переходов в возбужденные электронные состояния.

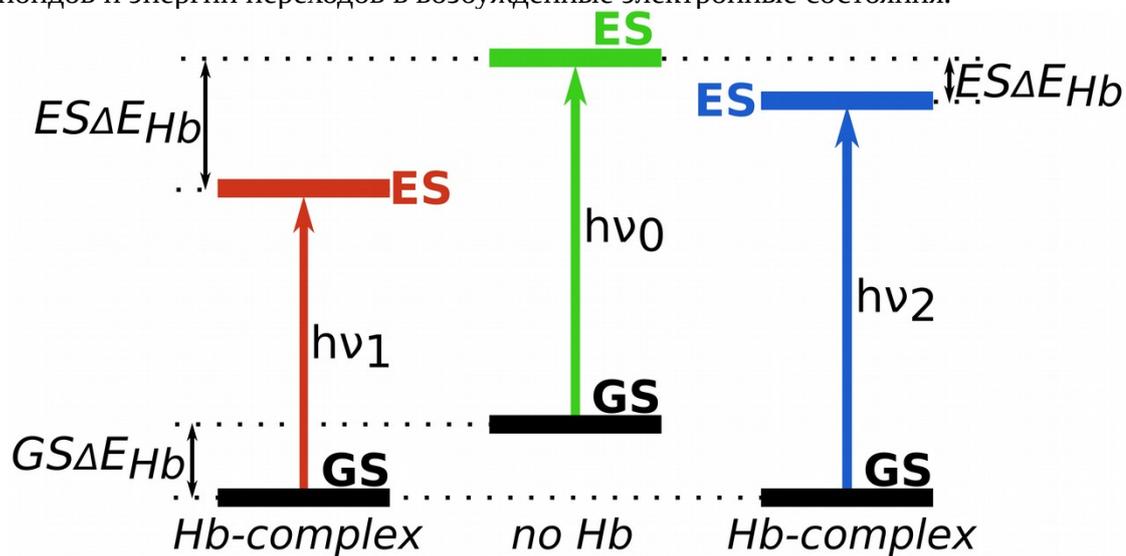


Рисунок 2.2. Схема оценки энергии водородной связи в возбужденном электронном состоянии. На диаграмме представлено основное электронное состояние GS (Ground State) комплекса, связанного водородными связями ‘Hb-complex’, и без водородных связей ‘no Hb’, разница энергии этих комплексов равняется энергии водородной связи в основном электронном состоянии $GS\Delta E_{Hb}$. Энергия водородной связи в возбужденном состоянии $ES\Delta E_{Hb}$ зависит от энергии связи в основном состоянии и энергии возбуждения $h\nu_1$ в молекулярных комплексах.

В работе оценены энергия образования водородных связей между кетогруппой циклического каротиноида и молекулами-донорами протона (молекулами воды и аминокислотными остатками тирозина и триптофана) (Рис. 2.2) как в основном (*Ground State*, GS) состоянии S_0 , так и возбужденных электронных состояниях (*Excited State*, ES) S_1 и S_2 . Энергия водородной связи в основном состоянии $GS\Delta E_{Hb}$ оценена в рамках методом BSSE. Энергия водородной связи в возбужденном состоянии $ES\Delta E_{Hb}$ является важной характеристикой, которая позволяет оценить динамику молекулярного комплекса в возбужденном состоянии. Ввиду того, что прямое вычисление энергии $ES\Delta E_{Hb}$ провести невозможно, для оценки этой энергии использована эмпирическая схема [Poterya и др., 2012; Song, Ma, 2013; Zhao, Han, 2012]. В рамках примененной схемы вычисленные значения энергии

электронного возбуждения пигмента в свободном состоянии $h\nu_0$ и при образовании водородных связей $h\nu_1$ и $h\nu_2$ (Рис. 2.2) используются для оценки соотношения между вычисленной энергией взаимодействия в основном состоянии $GS\Delta E_{\text{нб}}$ и неизвестной энергией $ES\Delta E_{\text{нб}}$. Если при образовании водородной связи происходит сдвиг энергии возбуждения в длинноволновую область (батохромный сдвиг, случай $h\nu_1$ на Рис. 2.2), то ее относительная энергия на поверхности возбужденного состояния растет ($ES\Delta E_{\text{нб}} > GS\Delta E_{\text{нб}}$). Если происходит сдвиг в коротковолновую область (гипсохромный сдвиг, случай $h\nu_2$ на Рис. 2.2), то энергия водородной связи уменьшается ($ES\Delta E_{\text{нб}} < GS\Delta E_{\text{нб}}$).

2.4 Реализация методов исследования

Примененные методы вычислительной квантовой химии многократно подтвердили свою эффективность в отношении описания π -сопряженных систем и, в частности, каротиноидов [Cerezo и др., 2012; Napiot и др., 2001; Martins и др., 2009; Bondanza и др., 2020; Bulat и др., 2005; Champagne и др., 2000; Dreuw, 2006; Dreuw, Fleming, Head-Gordon, 2003; Götze, 2019; Götze, Thiel, 2013; Körzdörfer, Brédas, 2016; Li, Yong, Zeng, 2018; Mori, 2016; Otsuka, Mori, Takano, 2016; Zhao, Truhlar, 2006] [Dreuw, 2006; Dreuw, Fleming, Head-Gordon, 2003].

Все расчеты DFT и TDDFT были проведены с использованием программного пакета ORCA 4.X [Neese, 2012].

Расчеты в рамках метода XMCQDPT2 проведены с использованием программного пакета Firefly QC [Firefly, 2013], который частично основан на исходном коде программного пакета GAMESS (US) [Schmidt и др., 1993]. Расчеты проведены с использованием вычислительных ресурсов МГУ имени М.В.Ломоносова, в том числе вычислительных ресурсов кафедры биофизики биологического факультета, кафедры физической химии химического факультета и суперкомпьютерного комплекса Ломоносов.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Основное внимание в работе уделено циклическим каротиноидам, боковая группа которых представлена кето- β -иононовым кольцом (Рис. 3.1).

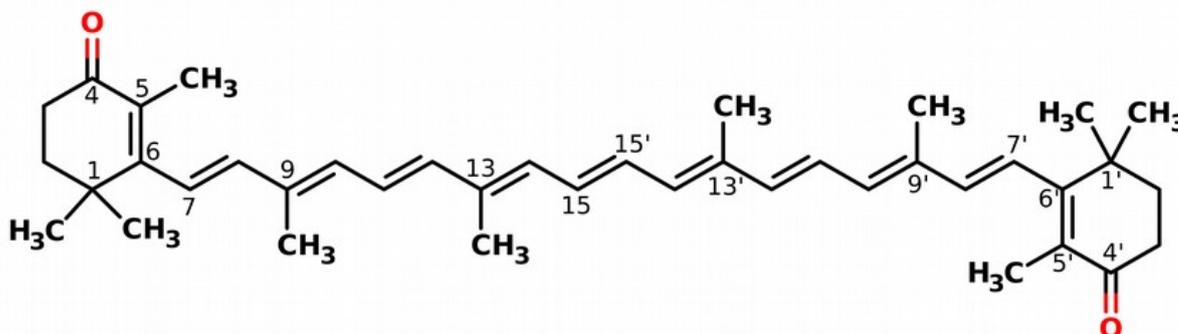


Рисунок 3.1. Химическое строение циклического кето-каротиноида — кантаксантина. На рисунке представлена общепринятая нумерация атомов цепи.

3.1 Конформация основного электронного состояния каротиноидов

Каротиноиды являются линейными молекулами, в конформационном минимуме стремящимися занять плоскую конформацию π -сопряженной цепи.

Сопряженная цепь каротиноидов, обуславливающая оптические свойства этих молекул, представлена рядом sp^2 -гибридизованных атомов углерода. Вдоль сопряженной цепи чередуются короткие (псевдо-двойные) и длинные (псевдо-одинарные) связи.

Для исследованных в этой работе каротиноидов наиболее энергетически стабильному состоянию соответствует полностью-транс плоская конформация, исключением является только двугранный угол C6-C7 связи (нумерация представлена на Рис. 3.1). Типичный энергетический барьер цис-транс изомеризации составляет 40 кДж/моль для длинных и 140 кДж/моль для коротких связей (Рис. 3.2). Рассчитанные в рамках методов DFT/D3 поверхности потенциальной энергии (ППЭ) вращения двугранных углов указывают на то, что длина сопряженной связи определяет энергетический барьер цис-транс переходов в каротиноидах, при этом барьер вращения вокруг коротких связей более чем в 3 раза выше, чем барьер вращения длинных связей цепи.

Для расчета поверхностей потенциальной энергии вращения связей линейной (нециклической) части сопряженной цепи использован модельный нециклический каротиноид ди-апо-эхиненон (Рис. 3.2, структурная формула приведена над графиками ППЭ).

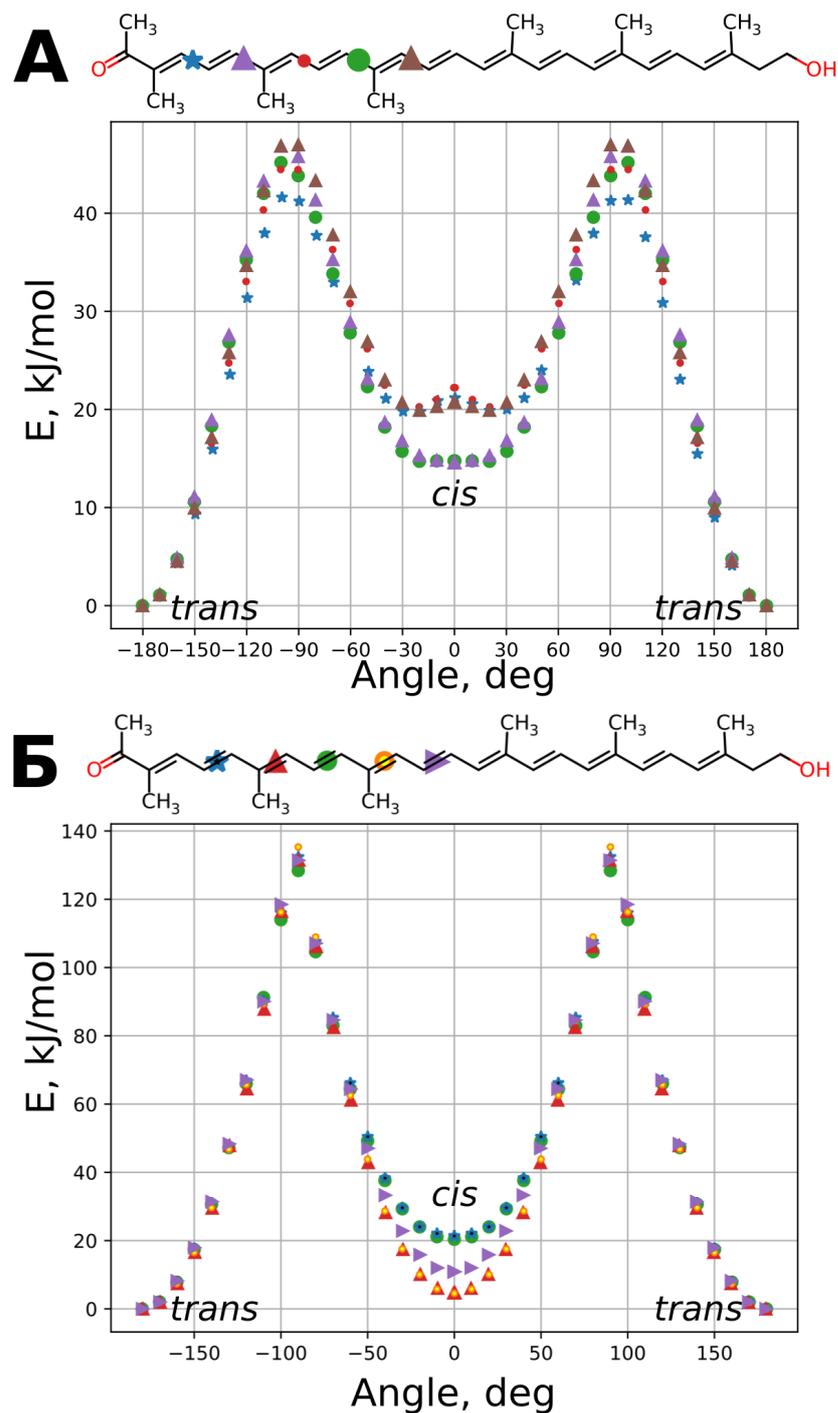


Рисунок 3.2. Рассчитанная ППЭ цис-транс изомеризации псевдо-одинарных (А) и псевдо-двойных (Б) сопряженных связей ди-апо-эхиненона. Маркеры отвечающие каждой конкретной связи указаны на структурной формуле модельного каротиноида над соответствующим графиком ППЭ.

Вычислено изменение паттерна ВЛА в зависимости от локального окружения каротиноида (Рис. 3.3).

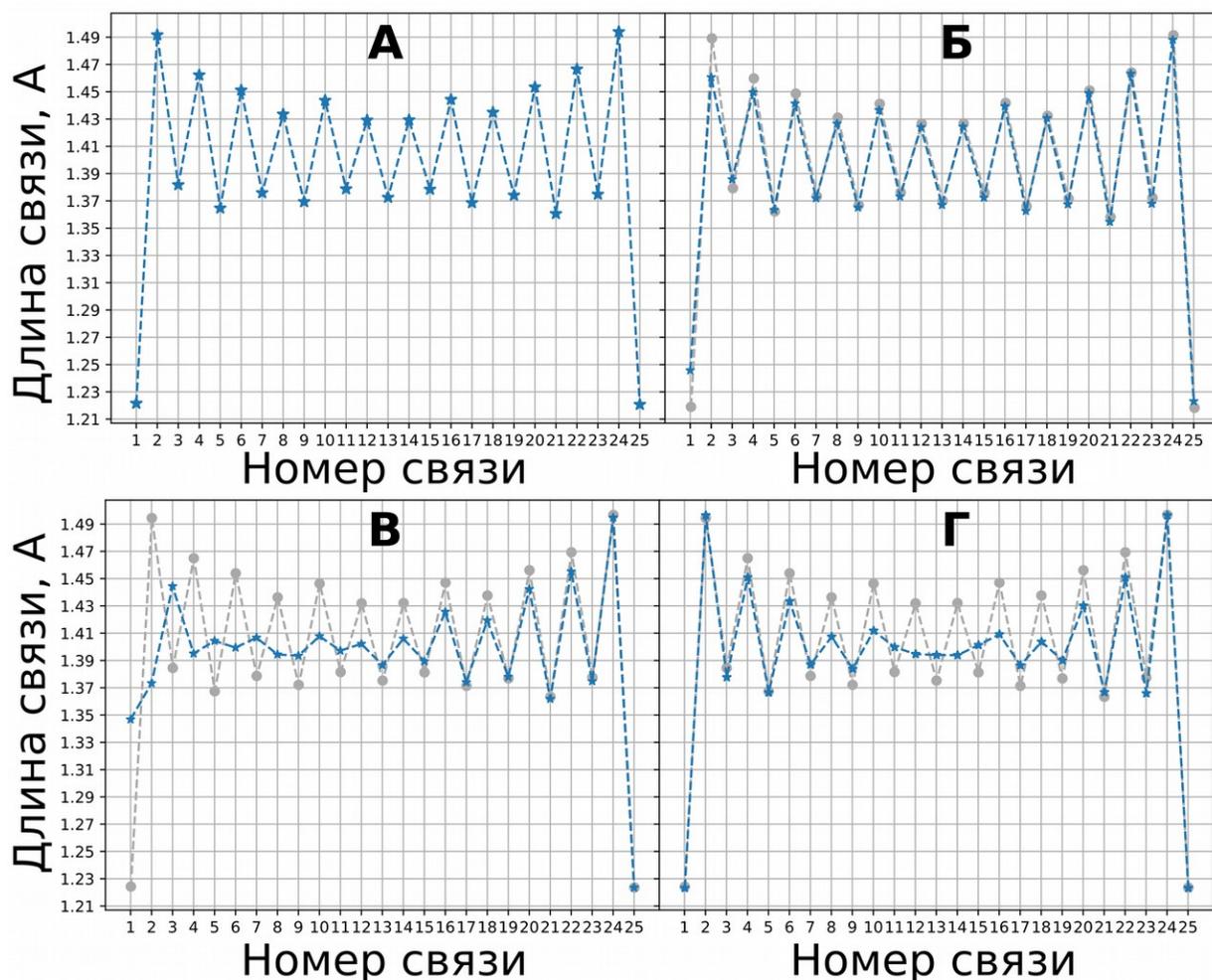


Рисунок 3.3. Длины связей вдоль сопряженной цепи равновесных конформаций различных молекулярных состояний кантаксантина. А — геометрический минимум основного состояния (S0); Б — геометрия комплекса, связанного водородными связями с «первой» кетогруппой; В — кантаксантин, протонированный по «первой» кетогруппе; Г — геометрический минимум катион-радикала кантаксантина.

Отдельно рассмотрено влияние циклизации боковой группы на потенциал вращения двугранного угла вокруг связи С6-С7 (нумерация атомов приведена на Рис. 3.1). Наличие боковой циклической группы, представленной кето-β-иононовым кольцом, в молекуле каротиноида обуславливает несколько конформационных особенностей. Во-первых, кето-β-иононовое кольцо в составе исследованных каротиноидов ECN (эхиненон) и CAN (кантаксантин), содержащее три sp^3 и три sp^2 атомов углерода, в равновесном состоянии не является плоским и способно принимать две альтернативные конформации (*pucker states*, *паккерные состояния*) (Рис. 3.4.1 конформации типа А и В). Рассчитанный потенциальный

барьер перехода между паккерными состояниями составляет 26 кДж/моль. Во-вторых, равновесные состояния поворота β -иононового кольца определяются как π -сопряжением, так и стерическим отталкиванием метильных заместителей в положениях C1 и C5 с заместителями в положениях C7 и C8. Стерическое отталкивание значительно деформирует поверхность потенциальной энергии вращения бокового кольца относительно плоскости сопряженной цепи. При этом транс-конформация становится менее энергетически выгодной, а координата локального транс-минимума энергии зависит от паккерного состояния, в котором находится β -иононовое кольцо (Рис. 3.4.2, -160 градусов для паккерного состояния типа А, и 160 градусов для паккерного состояния типа В). Показано, что при протонировании кетогруппы каротиноида ППЭ вращения C6-C7 связи значительно изменяется (Рис. 3.5). Барьер вращения в протонированном состоянии значительно выше и цис- и транс-состояния практически вырождены по энергии. Конформационное состояние кольца также как и в непротонированной форме определяет положение транс-минимума.

Барьер вращения вдоль C6-C7 связи для исследованных кето-каротиноидов в рамках методов DFR/D3 не превышает 15 кДж/моль, что значительно меньше, чем барьер вращения связи аналогичной длины основной сопряженной цепи каротиноида. Это, в свою очередь, указывает на бóльшую частоту цис-транс переходов вокруг связи C6-C7. Ввиду того, что цис-конформация кето- β -иононового кольца выгоднее на 4 кДж/моль, чем транс-конформация, в свободном состоянии кантаксантин будет преимущественно заселять C6-цис-состояние. На основании вычисленной энергии цис- и транс-конформаций можно провести оценку константы равновесия между этими состояниями для свободного кето-каротиноида. В нормальных условиях отношение концентрации конформеров составляет 80:16:4, для цис-цис, цис-транс и транс-транс конформаций бокового цикла соответственно. Из-за того, что равновесный угол C6-C7 имеет два транс-минимума, значение которого зависит от вырожденного по энергии конформационного состояния кето- β -иононового кольца, суммарная вероятность обнаружить боковую циклическую группу в одной транс конформации (например, в конформации [Тип А, 160 градусов]) становится в два раза меньше и составляет 6%. Проведенные оценки позволяют заключить, что в свободном виде циклический каротиноид будет самопроизвольно переходить между цис- и транс-конформациями кето- β -иононового кольца, при этом 88 % ансамбля в условиях равновесия будет находиться в цис-конформации.

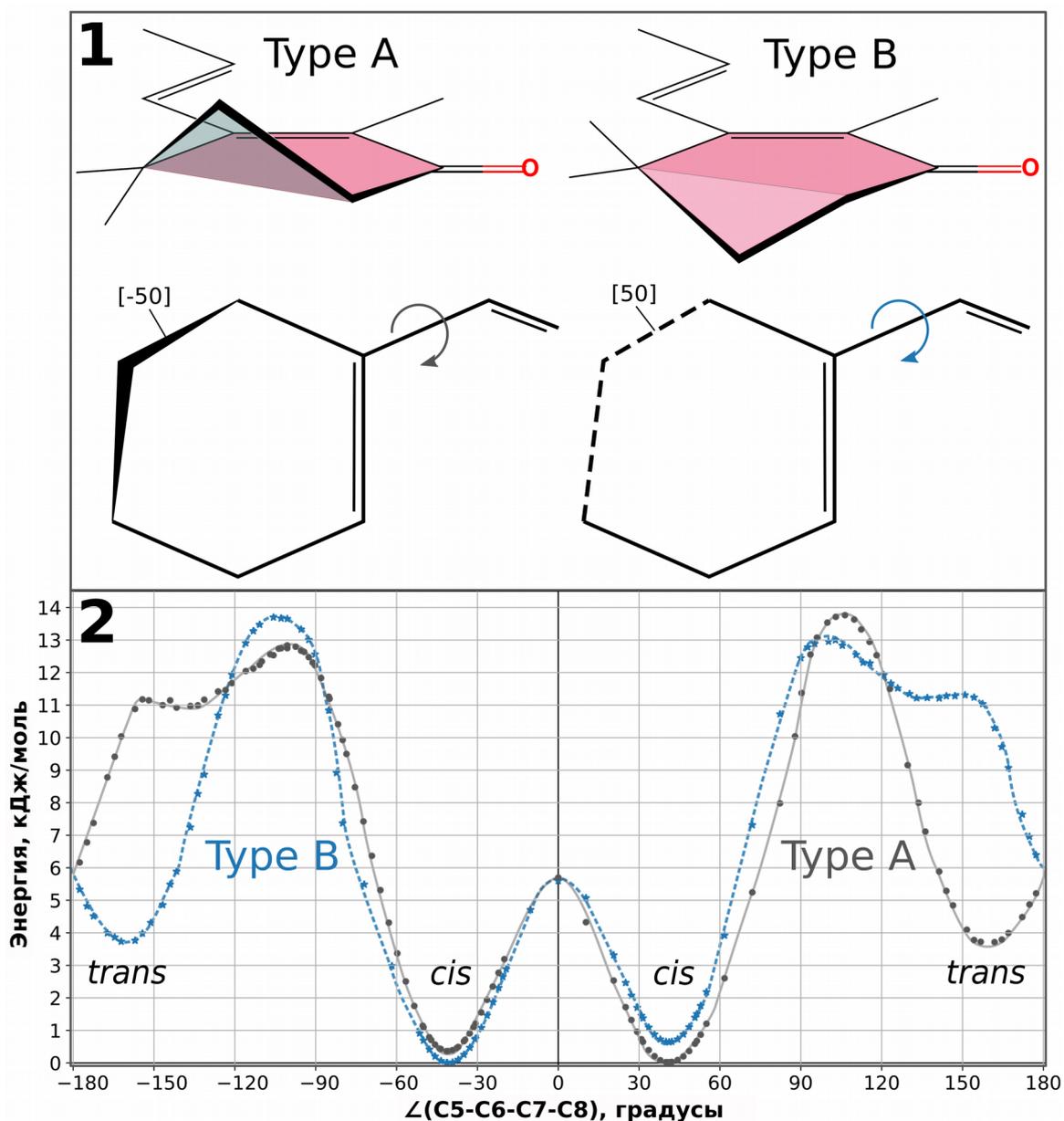


Рисунок 3.4.1 — конформация альтернативных состояний кето- β -иононового кольца (в квадратных скобках указано значение двугранного угла, определяющего тип конформации); 3.4.2 — рассчитанная ППЭ цис-транс изомеризации боковой циклической группы (вокруг связи C6-C7) для альтернативных состояний кето- β -иононового кольца.

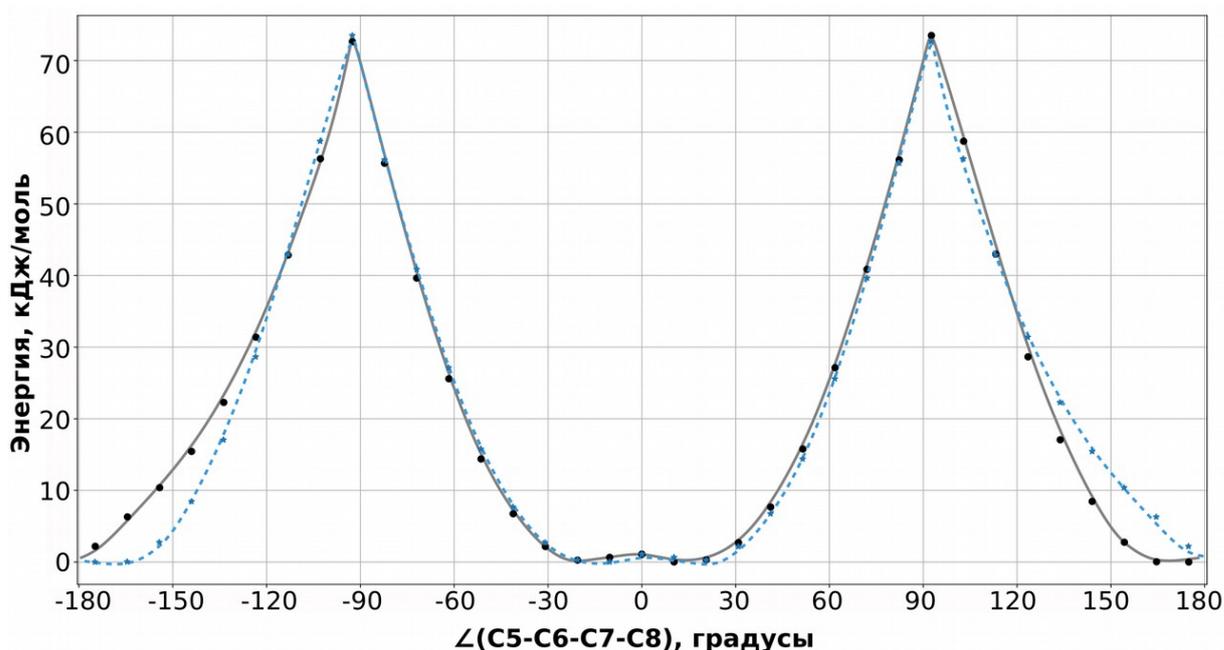


Рисунок 3.5. Поверхность потенциальной энергии вращения боковой циклической группы протонированного по кетогруппе карбкатиона ECN, серая кривая соответствует состоянию кольца А, синяя кривая состоянию В.

Структурные данные о конформации каротиноида в составе ОСР₀ получены на основании результатов кристаллографии (PDB id: 3mg1, 3mg2, 3mg3, 5ui2, 5tux, 5tv0, 5hgr). Молекула каротиноида, связанная с белковым окружением, значительно деформирована (Рис. 3.6), и вычисленные поверхности потенциальной энергии каротиноидов позволяют рассчитать величину потенциальной энергии, запасенной в результате отклонения от конформационного (плоского) оптимума. О деформации каротиноида в составе ОСР₁ можно судить на основании кристаллических структур RCP (PDB id: 4xb4, 5fcx) (Таблица 3.1).

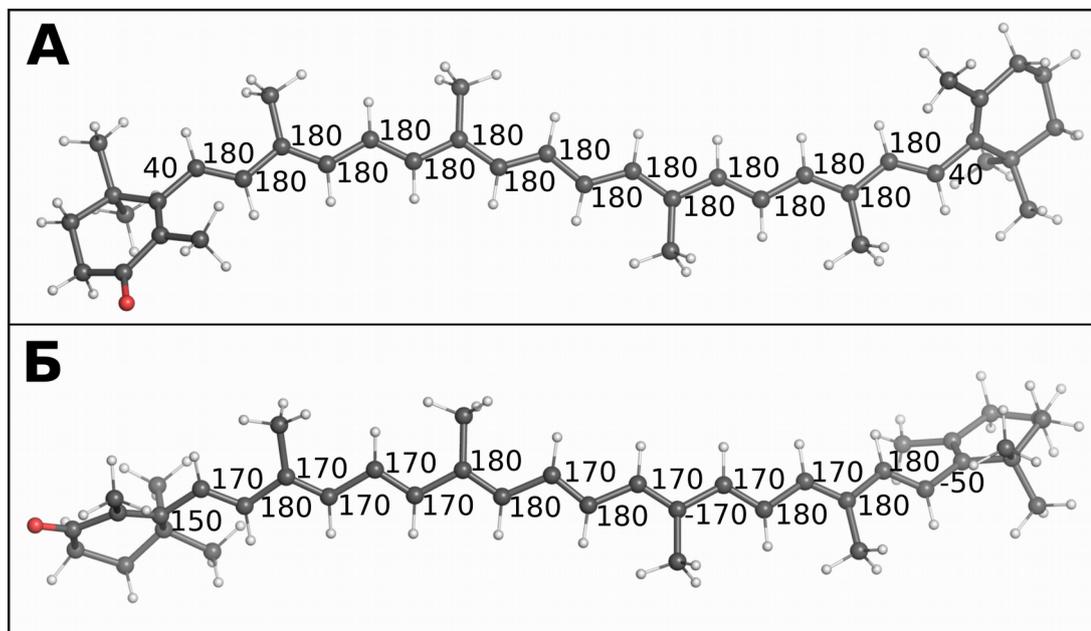


Рисунок 3.6. Структура ядерного остова эхиненона (ECN) в равновесной конформации (А) и в составе белка ОСРо (3mg1) (Б). Цифровые подписи отражают значения двугранного угла цепи вдоль соответствующей связи, для наглядности числа округлены до десятка.

Энергия, соответствующая деформированному состоянию, очевидно, компенсируется благодаря взаимодействию с белковым остовом. Именно влиянием белкового окружения можно объяснить то, что кето- β -иононое кольцо каротиноида, соединенное парой водородных связей с боковыми радикалами тирозина и триптофана, в неактивной форме ОСРо находится в транс-конформации и не переходит в собственный конформационный цис-минимум. В активированной форме ОСРr кето- β -иононое кольцо каротиноида переходит в цис-конформацию, и этот процесс можно рассматривать как самопроизвольный и вызванный освобождением каротиноида от пары водородных связей в С-доме.

Принимая, что суммарная внутренняя энергия, соответствующая малым деформациям двугранных углов, ведет себя как аддитивная величина $E_{\Sigma} = \sum (E_i(\theta_i))$ (здесь E_{Σ} – суммарная внутренняя энергия деформированного каротиноида, $E_i(\theta_i)$ – энергия, отвечающая деформации отдельного двугранного угла, θ_i - значение отдельного двугранного угла каротиноида по данным кристаллографических структур), и при учете вычисленных зависимостей энергии поворота вдоль каждого отдельного двугранного угла (ППЭ на Рис. 3 и 5) вычислена внутренняя энергия, соответствующая конформации каротиноида в составе ОСР.

Среднее значение внутренней энергии соответствующих конформаций каротиноида составляет 40 кДж/моль для ОСРо и 10 кДж/моль для ОСРr.

Таблица 3.1. Значение двугранных углов вдоль сопряженной цепи каротиноида в составе ОСРо и RCP (модель ОСPr) на основании доступных рентгеноструктурных данных

Двугранный угол	Среднее значение \mp стандартное отклонение, град	
	ОСРо	RCP (ОСPr)
$\angle(\text{C5-C6-C7-C8})$	130.4 \mp 21.9	6.7 \mp 52.4
$\angle(\text{C6-C7-C8-C9})$	174.9 \mp 5.0	179.2 \mp 1.5
$\angle(\text{C7-C8-C9-C10})$	193.4 \mp 19.6	192.6 \mp 19.7
$\angle(\text{C8-C9-C10-C11})$	171.4 \mp 6.4	179.0 \mp 2.0
$\angle(\text{C9-C10-C11-C12})$	169.4 \mp 11.9	180.7 \mp 5.1
$\angle(\text{C10-C11-C12-C13})$	172.0 \mp 4.7	177.5 \mp 1.9
$\angle(\text{C11-C12-C13-C14})$	178.9 \mp 8.8	184.1 \mp 3.1
$\angle(\text{C12-C13-C14-C15})$	176.5 \mp 4.9	175.4 \mp 1.9
$\angle(\text{C13-C14-C15-C15}^{\prime})$	181.4 \mp 8.9	172.8 \mp 1.5
$\angle(\text{C14-C15-C15}^{\prime}-\text{C14}^{\prime})$	174.0 \mp 3.7	181.5 \mp 5.4
$\angle(\text{C15-C15}^{\prime}-\text{C14}^{\prime}-\text{C13}^{\prime})$	179.7 \mp 9.3	180.1 \mp 6.2
$\angle(\text{C15}^{\prime}-\text{C14}^{\prime}-\text{C13}^{\prime}-\text{C12}^{\prime})$	174.0 \mp 3.9	179.7 \mp 1.25
$\angle(\text{C14}^{\prime}-\text{C13}^{\prime}-\text{C12}^{\prime}-\text{C11}^{\prime})$	183.4 \mp 22.3	178.7 \mp 3.3
$\angle(\text{C13}^{\prime}-\text{C12}^{\prime}-\text{C11}^{\prime}-\text{C10}^{\prime})$	171.5 \mp 4.2	180.6 \mp 1.1
$\angle(\text{C12}^{\prime}-\text{C11}^{\prime}-\text{C10}^{\prime}-\text{C9}^{\prime})$	175.0 \mp 13.2	180.1 \mp 0.8
$\angle(\text{C11}^{\prime}-\text{C10}^{\prime}-\text{C9}^{\prime}-\text{C8}^{\prime})$	174.3 \mp 3.7	179.4 \mp 0.8
$\angle(\text{C10}^{\prime}-\text{C9}^{\prime}-\text{C8}^{\prime}-\text{C7}^{\prime})$	187.9 \mp 19.1	175.6 \mp 6.1
$\angle(\text{C9}^{\prime}-\text{C8}^{\prime}-\text{C7}^{\prime}-\text{C6}^{\prime})$	177.5 \mp 2.6	178.7 \mp 1.1
$\angle(\text{C8}^{\prime}-\text{C7}^{\prime}-\text{C6}^{\prime}-\text{C5}^{\prime})$	293.8 \mp 16.0	207.8 \mp 15.7

3.2 Энергия водородной связи с кетогруппой каротиноида в основном электронном состоянии S0

В темновом состоянии ОСРо кетогруппа каротиноида образует пару водородных связей с боковыми остатками тирозина и триптофана. Наши расчеты показали, что для свободного каротиноида в конформационном минимуме энергия взаимодействия с боковыми остатками тирозина и триптофана более 50 кДж/моль (Таблица 3.2 и 3.3).

Таблица 3.2. Равновесная длина связи в комплексе ECN-Тур-Тгр, рассчитанная с использованием альтернативных функционалов DFT. Указано расстояние между акцептором протона ECN(O), протоном X(H) и соответствующими донорами протона X(O).

Метод	ECN(O)-Y(H), Å	ECN(O)-Y(O), Å	ECN(O)-W(H), Å	ECN(O)-W(N), Å
B3LYP/D3/6-311G++**	1.86	2.82	2.08	3.05
PBE0/6-311G++**	1.78	2.75	1.97	2.94
SAM-B3LYP/D3/6-311G++**	1.82	2.78	2.02	2.98

Таблица 3.3. Энергия водородных связей в комплексе ECN-Тур-Трп, рассчитанная в рамках метода BSSE с использованием альтернативных функционалов DFT. Значения указаны в кДж/моль. Столбцы отвечают энергии взаимодействия комплекса эхненон-триптофан (ECN-W) и тирозина (Y), эхненон-тирозин (ECN-Y) и триптофана (W), эхненон (ECN) и комплекса тирозин-триптофан (YW) соответственно.

Метод	(ECN-W)-Y	(ECN-Y)-W	ECN-YW
B3LYP/D3/6-311G++**	25	16	53
PBE0/6-311G++**	30	20	60
SAM-B3LYP/D3/6-311G++**	31	21	61

Внутри белкового кармана водородные связи деформированы, что должно уменьшить энергию взаимодействия.

Энергия водородной связи уменьшается при отклонении взаимной ориентации участников комплекса от равновесной конформации. Влияние взаимной ориентации на энергию водородных связей в комплексе кантаксантин-тирозин-триптофан было исследовано во рамках BSSE вдоль трех координат взаимного расположения участников комплекса: R_{hb} — расстояние между донором (кислород тирозина или азот триптофана) и акцептором протона (кетогруппа); A_{hb} — угол между донором протона, акцептором протона и первым заместителем акцептора протона (углерод C4); D_{hb} — двугранный угол между плоскостью бета-иононового кольца (кетогруппа, C4, C5) и донором протона.

Полученные результаты аппроксимированы аналитической функцией, подобно тому как это было сделано [Fabiola и др., 2002], но при добавлении члена, зависящего от двугранного угла $h(D_{hb})$:

$$E_{hb} = f(R_{hb}) + g(A_{hb}) + h(D_{hb});$$

$$f(R_{Hb}) = p_i * \left[\left(\frac{R_{0i}}{R_{Hb}} \right)^6 - \left(\frac{R_{0i}}{R_{Hb}} \right)^4 \right]$$

$$g(A_{Hb}) = 17.5 [1 - \cos(A_{Hb} - A_0)]$$

$$H(D_{Hb}) = 4.25 [1 - \cos(2D_{Hb})] + 6 \cos\left(\frac{D_{Hb}}{2}\right)$$

Где E_{Hb} – полная энергия водородной связи; $f(R_{Hb})$, $g(A_{Hb})$, $h(D_{Hb})$ – зависимость энергии водородной связи от соответствующей координаты (p_i составляют 200 и 135 кДж/моль для Y и W соответственно; $R_y = 2.8 \text{ \AA}$, $R_w = 3.0 \text{ \AA}$, а величины R_{0i} составляют $\sqrt{\frac{2}{3}} R_i$; $A_0 = 112$ градусов).

3.3 Расчет энергии возбужденных электронных состояний каротиноидов

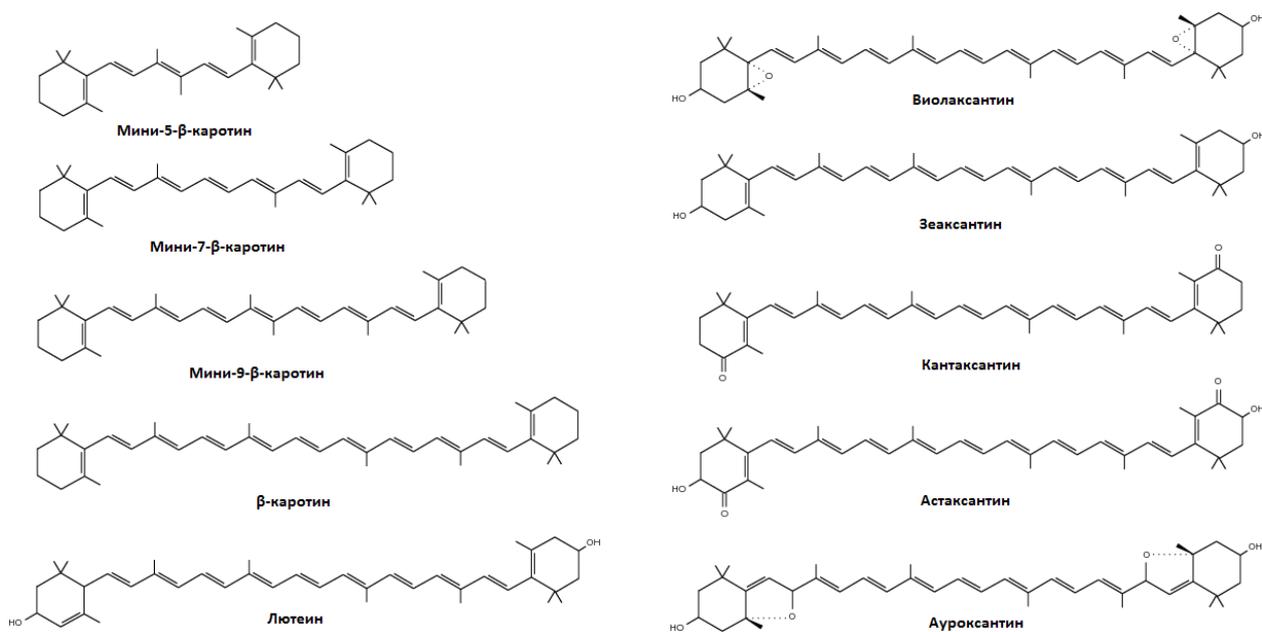


Рисунок 3.7. Химическое строение ряда исследованных циклических каротиноидов.

На Рисунке 3.7 представлены структуры каротиноидов, для которых были рассчитаны энергии возбужденных электронных состояний

Таблица 3.4. Сравнение результатов расчетов XMCQDPT2/SBKJC (CI), CAM-B3LYP/TDA/6-311+G* (TDDFT) экспериментальных данных для энергии вертикального перехода S_0-S_2 .

Название	Число сопряженных связей	Энергия перехода S_0-S_2 (CI), эВ	Энергия перехода S_0-S_2 (TDDFT), эВ	Экспериментальное значение энергии перехода S_0-S_2 в неполярном растворителе [Britton, 2004], эВ
β -каротин	11	2,73	2,73	2,75
виолаксантин	9	2,85	2,85	2,81
Лютеин	10	2,75	2,74	2,78
зеаксантин	11	2,75	2,74	2,75
кантоксантин	11	2,6	2,6	2,58
астаксантин	11	2,55	2,55	2,58
ауроксантин	7	3,14	3,14	3,1

Величины энергий возбужденных состояний каротиноидов обратно пропорциональны числу связей в сопряженной цепи. Молекулярные орбитали π -системы имеют сильно делокализованный характер, и населяющие их электроны обобществлены в равной степени между всеми атомами, входящими в сопряжение. Чем больше этих атомов, тем сильнее сопряжение, и тем сильнее стабилизировано возбужденное электронное состояние. В работе рассчитаны положения энергий первых трех возбужденных состояний для каротиноидов из гомологического ряда β -каротина с 5, 7, 9 и 11 сопряженными связями, их значения аппроксимированы гиперболой первого порядка (Рис. 3.8):

$$E = A + \frac{B}{n}, \text{ где } n - \text{ количество двойных связей в цепи.}$$

Эта зависимость содержит два параметра: A – асимптоту возбужденного состояния, которая соответствует энергии возбуждения каротина бесконечной длины, и B – коэффициент затухания, который характеризует эффективность стабилизации возбужденного электронного состояния всей сопряженной системой. Чем сильнее возбужденное состояние стабилизируется системой, тем меньше коэффициент B , тем быстрее энергия возбужденного состояния каротина приближается к своей асимптоте. Из трех рассчитанных возбужденных электронных состояний

с ростом сопряженной цепи сильнее всего стабилизируется T уровень, которому соответствует $V=6,45$ эВ. В свою очередь коэффициенты затухания для состояний S_1 и S_2 близки и равны 9,9 эВ и 10,35 эВ соответственно.

Таблица 3.5: Рассчитанная энергия T (основного триплетного) и S_1 состояния каротиноидов

Класс каротиноидов	Название	Тип заместителя	Число сопряженных связей	E(T), ВЗЛР/СВКЖС, эВ	E(S_1), ХМСQDPT2/СВКЖС, эВ	
					Расчет	Эксперимент
каротины	Мини-5	None	5	1,47	2,91	2,81 [Frank и др., 1997; Phillip и др., 1996]
	мини-7	None	7	1,03	2,39	2,47 [Frank и др., 1997; Phillip и др., 1996]
	мини-9	None	9	0,9	2,11	2,05 [Andersson и др., 1992]
	β -каротин	None	11	0,75	1,79	1,75 [Phillip и др., 1996]; 1,76 [Frank и др., 1997]
ксантофиллы	виолаксантин	Эпоксидная С5-С6 + Гидроксильная С3	9	0,77	1,95	1,87 [Frank и др., 1994; Phillip и др., 1996]; 1,8 [Polívka и др., 1999]
	Лютеин	Гидроксильная С3	10	0,79	1,84	1,87 [Josue, Frank, 2002]; 1,82 [Frank и др., 1997]
	зеаксантин	Гидроксильная С3	11	0,74	1,79	1,73 [Phillip и др., 1996]; 1,76 [Frank и др., 1994; Frank и др., 1997]; 1,74 [Polívka и др., 1999]
	кантоксантин	Кетонная С4	11	0,6	1,65	1,65 [Phillip и др., 1996]; 1,67 [Frank и др., 1997]
	астаксантин	Гидроксильная С3 + Кетонная С4	11	0,59	1,63	1,67 [Frank и др., 1997]
	ауроксантин	Эпоксидная С5-С8	7	0,89	2,22	-

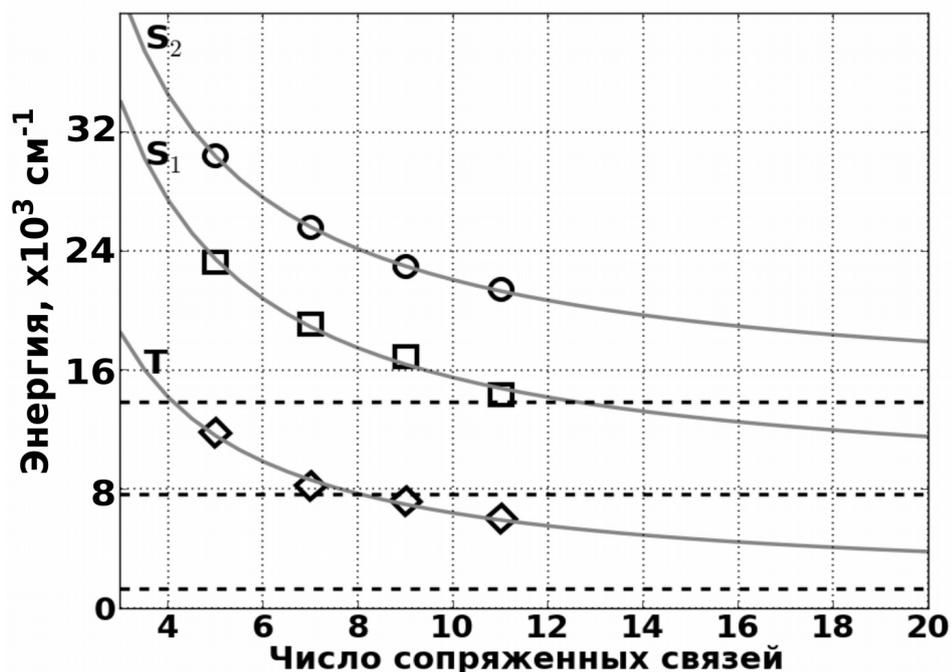


Рисунок 3.8. Аппроксимация зависимости энергии первых трех возбужденных состояний от размера сопряженной цепи гомологического ряда β -каротина. Сплошные линии — результат аппроксимации рассчитанных значений гиперболой первого порядка, пунктирные линии — энергетические асимптоты соответствующих состояний, составляющие 1200, 7600, 13900 см^{-1} .

Рассчитанная асимптота S_2 для гомологов β -каротина совпадает с таковой у нециклических каротиноидов [Catalán, Paz, 2004]. Стоит отметить взаимное расположение асимптот T и S_1 уровней. В литературе часто можно встретить способ выразить S_1 состояние как возбуждение, равное двум T возбуждениям, в связи с этим сложилось представление, что $E(S_1) \approx 2 \cdot E(T)$ (впервые в [Tavan, Schulten, 1987]). Хотя для представителей с 5-15 сопряженными связями это соотношение выполняется, при гиперболической схеме аппроксимации оно не применимо для всего гомологического ряда. Рассчитанные нами асимптоты соотносятся как $E(\lim(S_1)) \approx 6 \cdot E(\lim(T))$ благодаря малому значению энергетической асимптоты триплетного состояния. Такое низкое положение триплетного уровня больших сопряженных систем подтверждается современными исследованиями полиенов [Catalán, Paz, 2004], для которых сформулировано положение об энергетическом вырождении основного синглетного и триплетного уровней. Несмотря на низкое (0,15 эВ) энергетическое положение асимптоты T состояния для гомологического ряда β -каротина энергетического вырождения на основании проведенных расчетов не обнаружено.

Атом кислорода в составе ксантофилла может входить в различные замещающие группы, наиболее характерными из которых являются гидроксильная, эпоксидная и кетонная. Кислородный атом, ассоциированный с сопряженной системой, способен сильно влиять на характер распределения электронной плотности в молекуле. Это влияние условно делят на два эффекта: индуктивный и мезомерный. Оба эффекта являются следствием различной электроотрицательности химически связанных атомов кислорода и углерода. Ввиду большей электроотрицательности кислорода электронная плотность сдвигается в его сторону, что приводит к появлению отрицательного парциального заряда на кислороде и положительного парциального заряда на углероде. Такое смещение характерно как для σ -, так и для π -подсистем. Смещение σ -электронов в сторону кислорода плохо передается по цепи связанных атомов углерода, что приводит лишь к локальному изменению электронной плотности вблизи атома кислорода — это явление относится к индуктивному эффекту. Напротив, кислород, связанный π -связью с сопряженной системой (кетонная группа), смещает на себя электронную плотность не только от расположенного рядом атома углерода, но и от всех атомов углерода, входящих в сопряжение — это явление называется отрицательным мезомерным эффектом, потому что оно обедняет электронную плотность в сопряженной системе. Также стоит выделить особый случай, когда кислородный заместитель связан σ -связью (гидроксильная группа) с sp^2 -атомом углерода, входящим в состав сопряженной системы. В таком случае кислород взаимодействует с сопряженной системой своей неподеленной парой электронов, донируя ее в π -систему. Этот процесс повышает электронную плотность сопряженной системы и является положительным мезомерным эффектом. Мезомерный эффект сильно влияет на всю π -систему, которая, в свою очередь, определяет спектральные свойства каротиноидов. Для того чтобы оценить изменение спектральных свойств ксантофиллов относительно каротинов, содержащих одинаковое количество двойных связей, был произведен расчет спектральных свойств наиболее распространенных их представителей. В исследованный ряд вошли ксантофиллы, содержащие гидроксильную (ауроксантин, виолаксантин, лютеин, зеаксантин, астаксантин), эпоксидную (виолаксантин, ауроксантин) и кетонную (кантоксантин, астаксантин) группы.

На основании проведенных расчетов установлено, что для всех исследованных пигментов (Табл. 3.4) наличие кислородного заместителя в структуре приводит к сдвигу энергий вертикальных переходов из основного состояния в красную область. Самое сильное понижение энергий возбуждения обнаружено для ксантофиллов, содержащих кетонную группу в S_4 положении (Табл. 3.4 сравнение астаксантина, кантоксантина против β -каротина), которая влияет на всю сопряженную систему по механизму отрицательного мезомерного эффекта. Понижение энергии возбужденных состояний указывает на фактическое увеличение

эффективного числа сопряженных звеньев в π -системе. Эпоксидный атом кислорода в исследованных пигментах также понижает энергии возбужденных состояний, при этом эпоксидная группировка между C5-C6 атомами углерода (Табл. 3.4 виолоксантин против мини-9- β -каротина) понижает энергии возбуждений сильнее, чем C5-C8 эпоксид (Табл. 3.4 ауроксантин против мини-7- β -каротина). Гидроксильная группировка в C3 (Табл. 3.4 зеаксантин против β -каротина) положении практически не влияет на энергии первых трех возбужденных состояний, что можно объяснить слабым влиянием индуктивного эффекта, характерного для гидроксильной группы соединенной с sp^3 -атомом углерода (C3), на π -систему.

3.3.1 Функциональная интерпретация полученных результатов

Необходимым условием направленного переноса энергии возбуждения в молекулярном комплексе является более высокое расположение энергетического уровня донора, чем энергия возбуждения акцептора. В биологических системах относительно каротиноидов в качестве доноров электронного возбуждения выступают синглетный кислород ($a^1\Delta_g$), низшие триплетное (T) и синглетное (Qu) состояния хлорофилла, энергии возбуждения которых составляют 0,98 эВ, 1,36 эВ и 1,82 эВ соответственно. Акцептором энергии при тушении этих доноров могут выступать T и S1 уровни каротиноидов только в том случае, если их энергии возбуждения лежат ниже соответствующих уровней хлорофилла и кислорода.

Это, очевидно, относится и к положению триплетного уровня каротиноидов, который участвует в тушении синглетного кислорода и триплетного хлорофилла. Как видно из Табл. 3.5 и Рис. 3.6, тушить триплетный хлорофилл способны все гомологи β -каротина, в сопряженную систему которых входят 6 и большее число π -связей. Для тушения синглетного кислорода ($a^1\Delta_g$) положение T уровня должно находиться несколько ниже, этот факт приводит к тому, что гомологи β -каротина с 6 и 7 сопряженными связями, тушащие триплетный хлорофилл, не способны тушить синглетный кислород. Минимальное число π -связей в сопряженной системе для гомологов β -каротина (Рис. 3.6, кривая T), которые способны дезактивировать $a^1\Delta_g$ состояние кислорода, равно 8. Рассчитанная для исследованных ксантофиллов энергия возбуждения триплетного состояния лежит ниже 0,95 эВ (Табл. 3.5), что характеризует их как пигменты, способные акцептировать энергию возбуждения как триплетного хлорофилла, так и синглетного кислорода ($a^1\Delta_g$). При этом, принимая во внимание, что по результатам расчета кислородный заместитель в структуре пигмента понижает его энергию возбуждения (см. Влияние кислородных заместителей на положение возбужденных электронных состояний каротиноидов), можно предположить, что при модификации структуры каротина, содержащего 6 сопряженных связей, кетонной группировкой в C4 положение, произойдет понижение энергии возбуждения T состояния на величину порядка 0,1 эВ, что будет достаточно для того, чтобы

такой кислородсодержащий пигмент приобрел способность тушить синглетный кислород.

Положение S_1 состояния, в свою очередь, определяет возможность каротиноидов тушить Q_y состояние хлорофилла. Энергии S_1 уровня представителей гомологического ряда β -каротина (Рис. 3.6, кривая S_1), содержащих 11 и большее число сопряженных связей, лежит ниже Q_y , что позволяет этим молекулам выступать в качестве акцепторов энергии возбуждения синглетного хлорофилла. Также тушителями Q_y состояния из исследованного ряда являются (Табл. 3.6) зеаксантин, астаксантин и кантоксантин. Лютеин, содержащий 10 сопряженных связей, и виолаксантин, содержащий 9 сопряженных связей, на основании проведенных расчетов не могут тушить Q_y состояние хлорофилла.

Таблица 3.6. Биологическая роль представителей исследованного ряда каротиноидов. В таблице рассмотрены три возможных реакции с участием каротиноидов: тушение синглетного кислорода, тушение триплетного хлорофилла и тушение синглетного хлорофилла ($^1O_2 \rightarrow Car$, $Chl (T) \rightarrow Car$ и $Chl (S_1) \rightarrow Car$ соответственно). + и - отражает возможность отдельного каротиноида катализировать конкретный направленный перенос энергии.

Каротиноид	Число сопряженных связей	Тушение $a^1\Delta_g$ состояния кислорода	Тушение триплетного состояния хлорофилла	Тушение Q_y состояния хлорофилла
Мини-5- β -каротин	5	-	-	-
Мини-7- β -каротин	7	-	+	-
Мини-9- β -каротин	9	+	+	-
β -каротин	11	+	+	+
Лютеин	10	+	+	-
Виолаксантин	9	+	+	-
Зеаксантин	11	+	+	+
Кантаксантин	11	+	+	+
Астаксантин	11	+	+	+
Ауроксантин	7	+	+	-

Рассчитанные энергии возбужденных состояний каротиноидов находятся в хорошем количественном согласии с имеющимися экспериментальными данными и позволяют провести функциональную классификацию исследованных каротиноидов. Тушителями синглетного

кислорода являются все гомологи β -каротина, содержащие больше 8 сопряженных связей, а также все исследованные ксантофиллы, энергии возбуждений которых во всех случаях ниже, чем энергии каротинов с тем же числом сопряженных звеньев в π -системе. К тушителям триплетного хлорофилла относятся все пигменты, которые способны тушить синглетный кислород, а также каротины с 7 и 8 сопряженными связями. Тушить синглетный хлорофилл способны только каротины, содержащие 11 и более сопряженных связей, и соответствующие этому числу π -связей ксантофиллы.

3.3.2 Влияние конформации каротиноида на сдвиг оптического спектра поглощения

В этой части работы было исследовано влияние деформации сопряженной цепи на смещение полосы оптического поглощения каротиноида. Оптическое поглощение каротиноида определяется относительной энергией основного состояния S_0 и второго возбужденного синглетного состояния S_2 . Поворот сопряженной цепи вдоль двугранных углов, как было показано ранее (Рис. 3.2, 3.4, 3.5), приводит к увеличению энергии основного состояния при приближении к прямому углу. Для оценки влияния этих конформационных изменений на оптический спектр каротиноида проведен расчет САМ-ВЗЛР/ТДА/6-311+G* относительной энергии состояния S_2 при деформации кантаксантина вдоль всех двугранных углов (Рис. 3.9), каждая точка соответствует конформации, отвечающей повороту соответствующего угла сопряженной цепи. Смещение спектра поглощения при изменении конформации каротиноида, которое определяется разностью энергий состояний S_0 и S_2 , оценено относительно полностью-транс плоской конформации. Показано, что деформация относительно плоской (-180, транс) ориентации вдоль двугранных углов псевдо-одинарных (длинных) связей приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения, а вдоль псевдо-двойных (коротких) к батохромному. Этот результат можно интерпретировать как эффект изменения эффективного сопряжения π -системы, при этом поворот вдоль длинных связей уменьшает, а поворот вдоль коротких увеличивает эффективное сопряжение. Известно, что с ростом сопряженной цепи разница между длинами псевдо-одинарных (длинных) и псевдо-двойных (коротких) связей уменьшается, а спектр поглощения смещается в красную область (эффективное сопряжение растет). Поворот любого двугранного угла сопряженной цепи приводит к уменьшению π -электронной плотности между парой центральных атомов этого угла, что приводит к увеличению расстояния между этими атомами как для псевдо-одинарных, так и для псевдо-двойных связей.

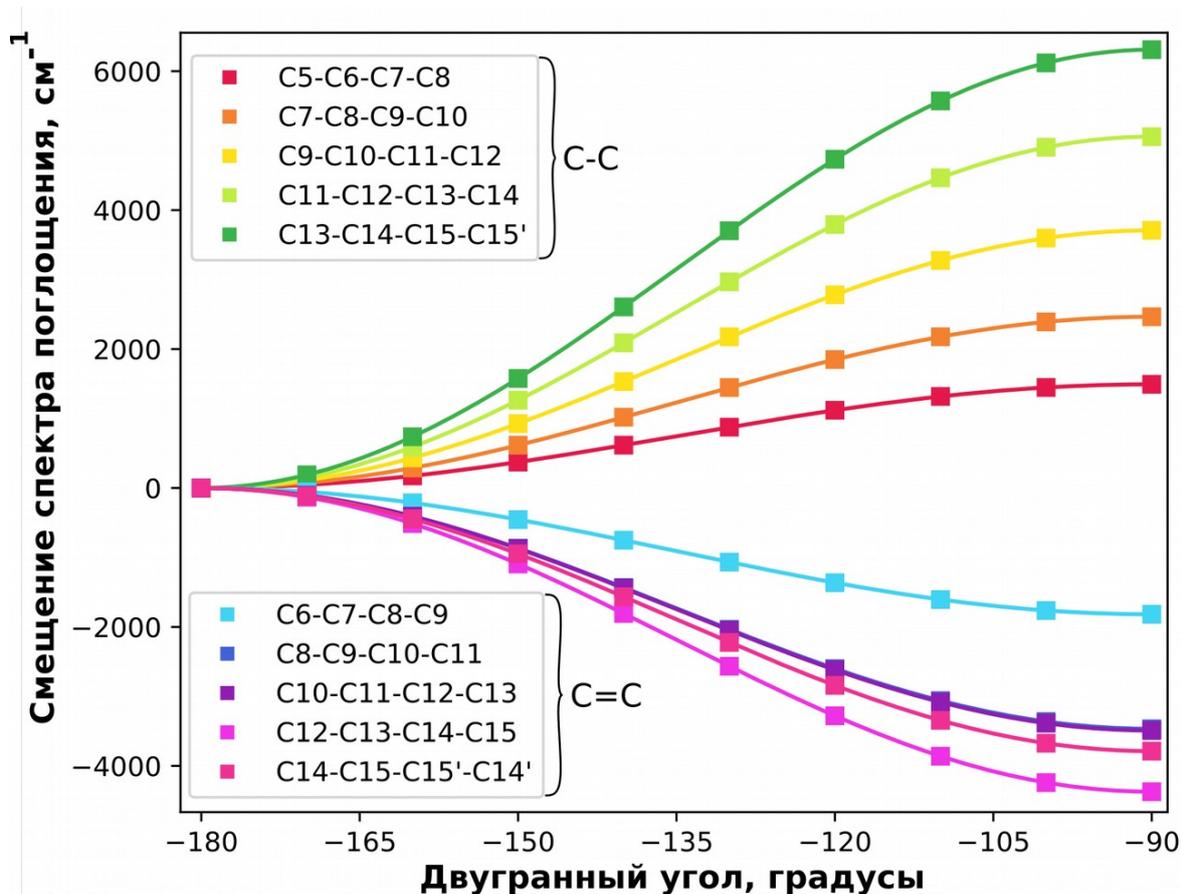


Рисунок 3.9. Расчет влияния поворота двугранных углов вдоль сопряженной цепи на смещение спектра поглощения кантаксантина (нумерация атомов приведена на Рис. 4). Поворот вокруг длинных связей приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения, поворот вдоль коротких связей приводит к батохромному сдвигу.

В случае вращения вокруг псевдо-одинарных связей их удлинение приводит к увеличению имеющейся разницы между длинами чередующихся связей цепи, что уменьшает эффективное сопряжение, что, в свою очередь, смещает спектр поглощения в синюю область. Напротив, в случае вращения вокруг псевдо-двойных связей удлинение этих связей приводит к уменьшению имеющейся разницы между длинами связей сопряженной цепи, что увеличивает эффективное сопряжение и смещает спектр поглощения в красную область.

На основании проведенных расчетов (Рис. 3.9) и доступных структурных данных (Таблица 3.1) можно рассчитать относительный сдвиг спектра поглощения ОСР, вызванный деформацией сопряженной цепи каротиноида в составе белка. Суммарное значение гипсохромного сдвига спектра поглощения составляет 1600 см^{-1} для каротиноида, связанного с ОСРо, и 460 см^{-1} для каротиноида в составе ОСРr, подтверждая батохромный сдвиг спектра поглощения ОСР при фотоактивации на 1140 см^{-1} (экспериментальное значение этого сдвига составляет 1100 см^{-1}).

Таким образом, батохромный сдвиг спектра поглощения ОСР, наблюдаемый при активации ОСРо и образовании ОСРг, может быть объяснен изменением конформации каротиноида внутри белковой глобулы.

На основании проведенного исследования можно сделать промежуточное заключение о том, что в составе ОСР каротиноид значительно деформирован. Потенциальная энергия деформации выше у каротиноида в составе ОСРо, чем в составе ОСРг (RCP). Изменение конформации двугранных углов сопряженной цепи каротиноида сопровождается батохромным сдвигом полосы поглощения ОСРг относительно ОСРо.

3.4 Альтернативные механизмы разрыва водородной связи на первичном этапе фотоактивации ОСРо

Пара водородных связей между тирозином и триптофаном белкового остова ОСР и кетогруппой каротиноида обеспечивает стабильность неактивного состояния ОСРо, удерживая каротиноид в деформированном состоянии внутри гидрофобного кармана, пронизывающего оба домена белка. Разрыв этих связей необходим для образования активной формы ОСРг, а триггером этого процесса является наличие сине-зеленого света. Для того чтобы описать процесс разрыва водородных связей под действием света, необходимо оценить изменение их энергии, происходящее во время существования возбужденного электронного состояния.

Энергия возбуждения при наличии и отсутствии водородных связей в основном состоянии рассчитана для кето-каротиноида эхиненона (ECN) (гомолог кантаксантина, содержащий одну кетогруппу) для состояний S1 и S2 и представлена в Таблице 3.7.

Образование водородной связи приводит к уменьшению относительной энергии состояния S2 на 1300 см^{-1} и практически не влияет на энергию S1 (Таблица 3.7 и Рис 3.10 и 3.11).

Таблица 3.7. Результат расчета энергии возбужденных состояний S1 и S2: свободного эхиненона ECN-0; комплекса эхиненона и триптофана ECN-W; комплекса эхиненона и тирозина ECN-Y; комплекса эхиненона, тирозина и триптофана ECN-YW; протонированной по кетогруппе формы эхиненона ECN(H+).

Соединени е	S1 (CI), XMCQDPT2/ def2-SVP, cm^{-1}	S ₂ (TDDFT), wB97X/D3/TDA /6-311++G**, cm^{-1}	S ₂ (TDDFT), CAMB3LYP/D3/T DA/6-311++G**, cm^{-1}	S ₂ (TDDFT(RI-wB2PLYP/ def2-TZVPP)), cm^{-1}
ECN	20210	22533.8	21322.4	23812.8
ECN-W	19723	21766.0	20498.9	22983.6
ECN-Y	19574	21721.3	20443.2	22937.1
ECN-YW	19540	21365.8	20004.8	22528.3

ECN(H ⁺)	-	14238.7	14399.9	13420.3
ECN(2H ⁺)	-	16645.9	16269.5	16129.6

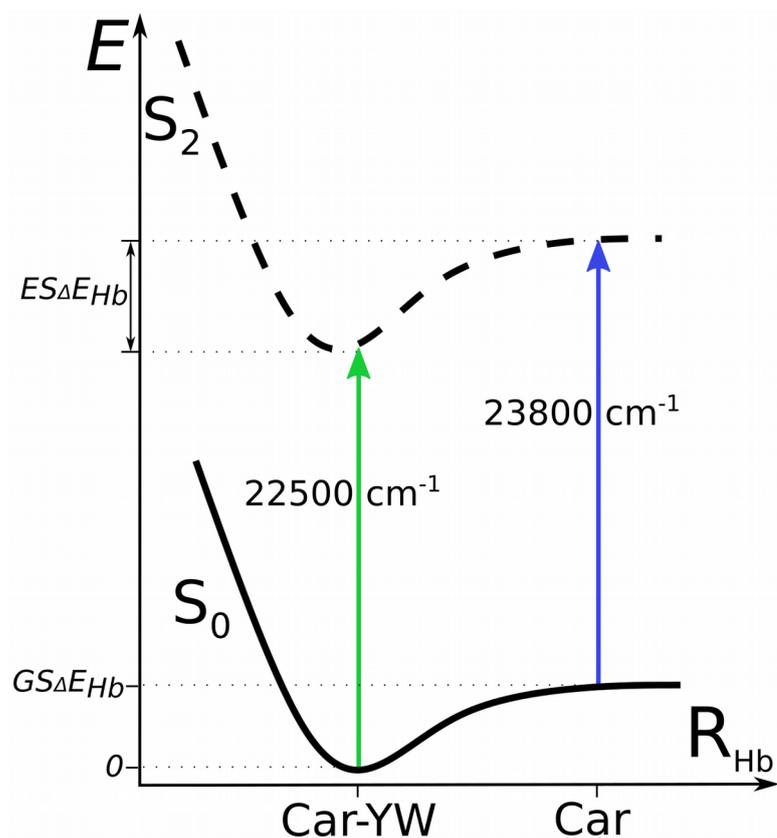


Рисунок 3.10. Энергетическая диаграмма оценки энергии водородной связи при поглощении кванта света и образовании возбужденного состояния S2.

Этот результат указывает на то, что энергия водородных связей в состоянии S2 ($ES\Delta E_{Hb}$) больше таковой в основном состоянии ($GS\Delta E_{Hb}$), то есть существующие в основном состоянии водородные связи становятся «крепче» в состоянии S2. При поглощении кванта света и переходе на ППЭ состояния S2 (пунктирная линия на Рис. 3.10), наклон этой поверхности, а следовательно ее градиент, направлен в сторону, противоположную координате разрыва водородной связи. Ввиду достаточности поглощенного кванта для преодоления энергетического барьера разрыва водородных связей $GS\Delta E_{Hb}$ подобный механизм (Рис. 3.12 Координата A) является возможным, хотя и представляется нам маловероятным.

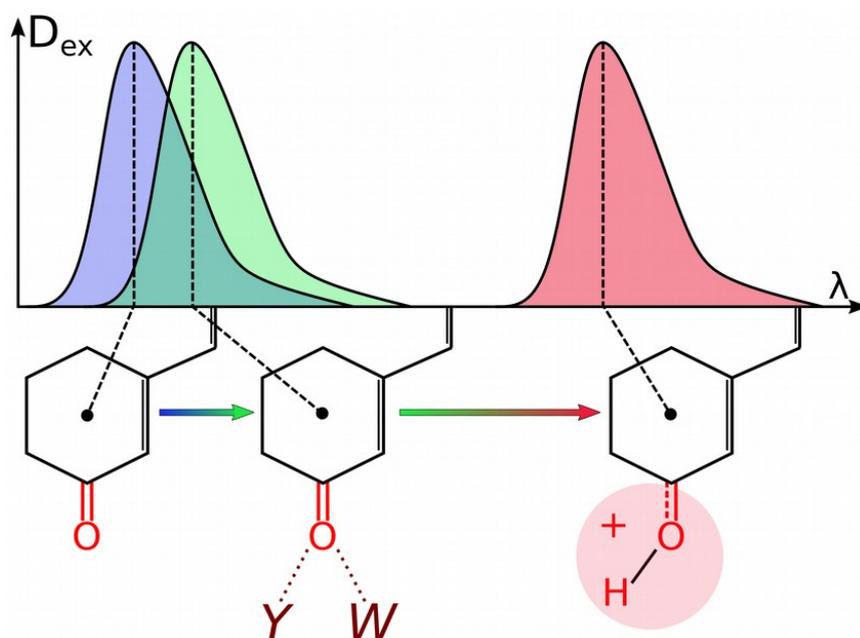


Рисунок 3.11. Иллюстрация рассчитанного сдвига спектра поглощения каротиноида в ходе образования водородных связей и протонированной формы.

В качестве альтернативы рассмотрен механизм фотодиссоциации водородных связей с разделением зарядов, в результате которого образуется протонированная форма кетокаротиноида (Рис 3.12, Координата В). Протонированная форма характеризуется сильным смещением спектра поглощения в красную область (Таблица 3.7).

Энергия переноса протона от аминокислотного остатка на кетогруппу каротиноида определяется следующей схемой:

- 1) $\text{ECN} + \text{Tyr(H)/Trp(H)} \longrightarrow \text{ECN(H)}^+ + \text{Tyr}^-/\text{Trp}^- + \Delta PA$
- 2) $\text{ECN} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{ECN(H)}^+ + PA_{\text{ECN}}$
- 3) $\text{Tyr(H)/Trp(H)} \longrightarrow \text{Tyr}^-/\text{Trp}^- + \text{H}^+ - PA_{\text{AA}}$

Для оценки возможности протекания реакции переноса протона на каротиноид было рассчитано сродство к протону для участников этого процесса (Таблица 3.8).

Рассчитанная в отсутствии внешнего электростатического поля разница между сродством к протону эхинонена ECN и комплекса тирозин-триптофан «Tyr-Trp complex» составляет $\Delta E_{\text{HA}} = 350$ кДж/моль, что больше энергии поглощенного кванта 270 кДж/моль (22500 см^{-1}), но при этом существенное влияние на процесс переноса протона может оказать белковое окружение.

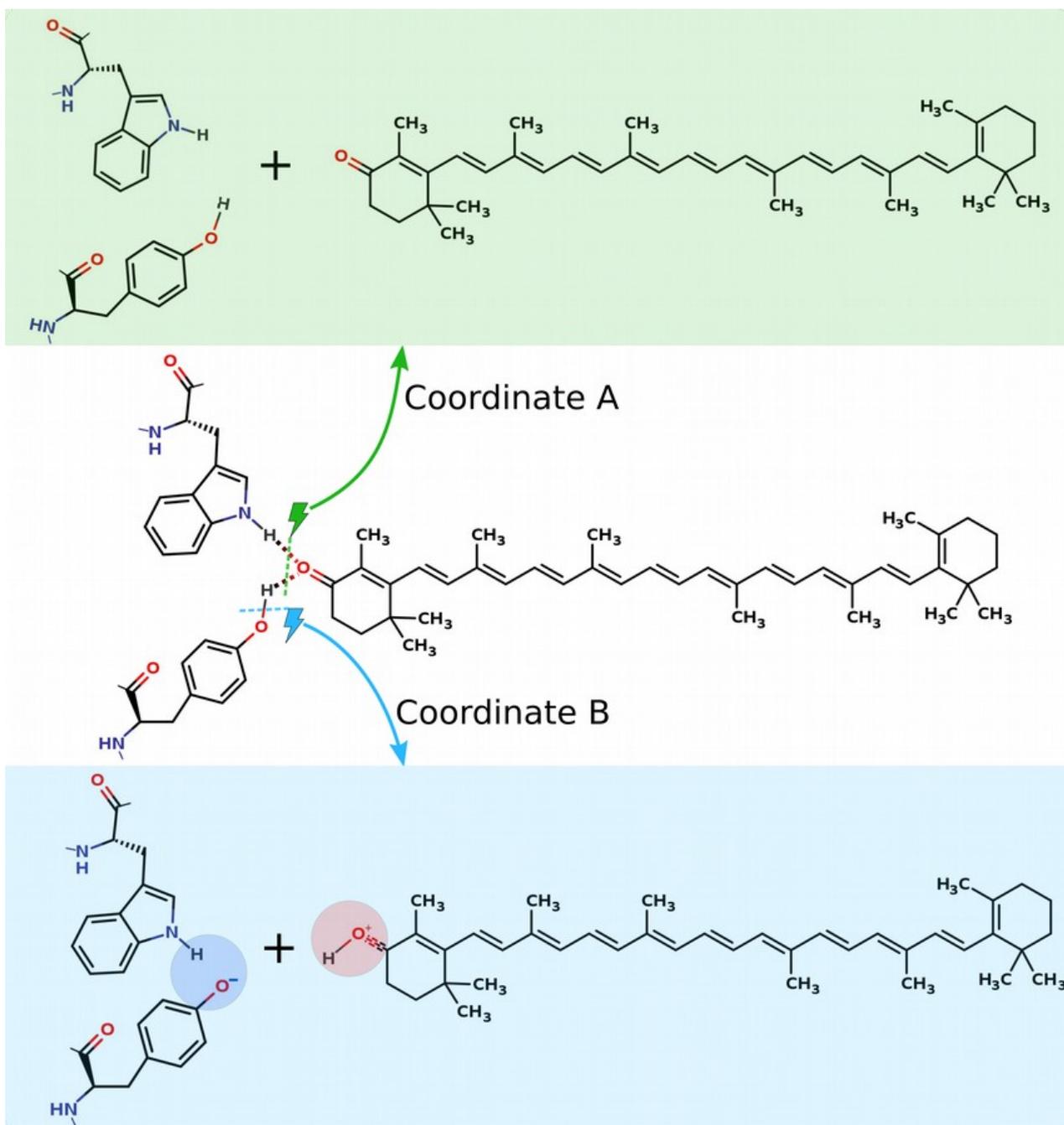


Рисунок 3.12. Исследованные механизмы разрыва водородной связи в ходе фотоактивации ОСР. Координата А — фотодиссоциация водородной связи по молекулярному механизму. Координата В — разрыв водородной связи с переносом протона на каротиноид.

3.5 Влияние внешнего электростатического поля на сродство к протону кетогруппы каротиноида PA_{ECN}

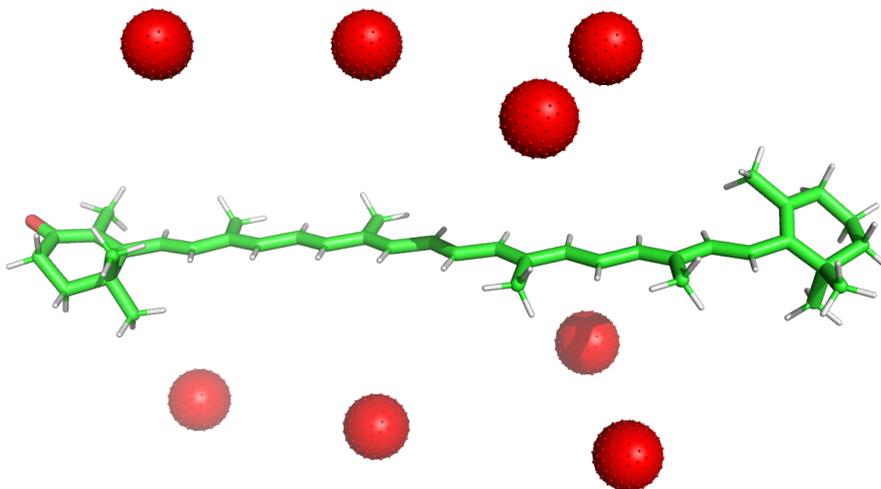


Рисунок 3.13. Расчетная сцена для оценки изменения сродства к протону кетогруппы эхиненона (изображен зеленым цветом) PA_{ECN} во внешнем электростатическом потенциале. Модельные потенциалы были введены в систему с помощью восьми точечных отрицательных зарядов (положение точечных зарядов отмечают красные сферы).

Для оценки влияния внешнего электростатического потенциала на сродство к протону кетогруппы эхиненона PA_{ECN} проведен ряд расчетов CAM-B3LYP/D3/6-311++G** в различных модельных потенциалах (Таблица 3.8). Модельные потенциалы были введены в систему с помощью восьми точечных отрицательных зарядов (Рис. 3.13). Различные модельные потенциалы были получены, варьируя значение точечных зарядов от 0,0 А.Е. до -0,5 А.Е. (распределение модельных потенциалов вдоль сопряженной цепи представлено на Рис. 3.14). Перед вычислением PA_{ECN} структура каротиноида была оптимизирована в модельном потенциале при сохранении расстояния до ближайшего точечного заряда.

Таблица 3.8. Средство к протону эхиненона (ECN) в ряде модельных электростатических потенциалов (номера модельных потенциалов соответствуют распределениям, приведенным на Рисунке 3.14).

Номер модельного потенциала	Вычисленное средство к протону (E_{HA}), кДж/моль
0	1073
1	1183
2	1344
3	1230
4	1346
5	1359
6	1400

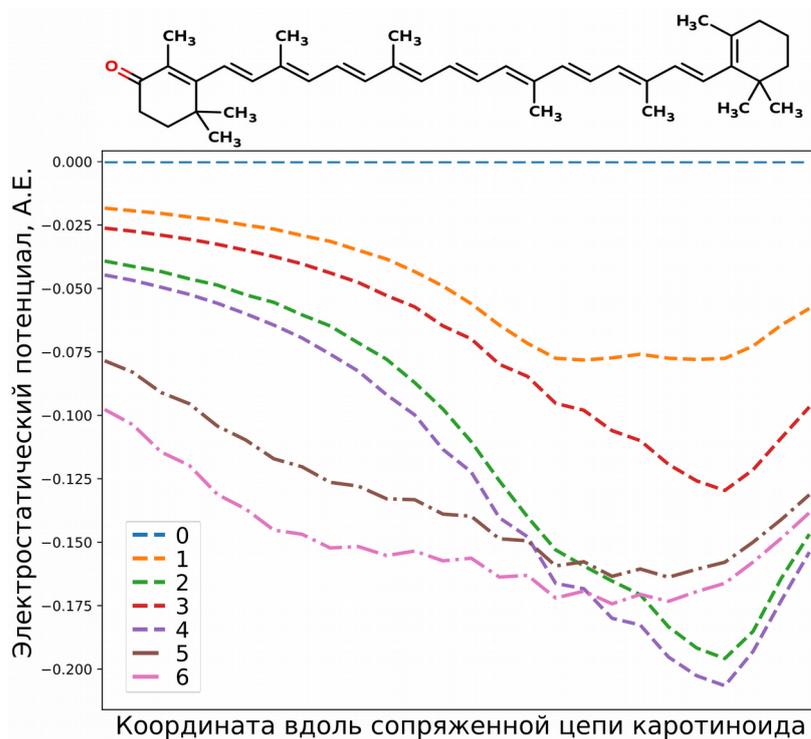


Рисунок 3.14. Распределение модельных электростатических потенциалов вдоль сопряженной цепи каротиноида. В тексте обсужден модельный потенциал `3` (зеленая пунктирная кривая).

В соответствии с результатом проведенной оценки действие внешнего электростатического поля можно разделить на два условно независимых эффекта: с одной стороны, внешний электростатический потенциал в окрестности кетогруппы взаимодействует с

положительным зарядом протона (для модельного потенциала δ^+ (Таблица 3.8 Рисунок 3.14) энергия этого взаимодействия составляет 100 кДж/моль), с другой стороны, действие потенциала на каротиноид приводит к перераспределению электронной плотности вдоль сопряженной цепи каротиноида (для модельного потенциала δ^+ увеличение электронной плотности на кетогруппе каротиноида эффективно увеличивает сродство к протону еще на 170 кДж/моль, что эквивалентно изменению потенциала, взаимодействующего с протоном на дополнительные -0.06 А.Е.). Таким образом, несмотря на то, что отрицательный полюс потенциала значительно удален от кетогруппы, электронная плотность делокализованной π -системы «выдавливается» в сторону кетогруппы, что значительно увеличивает сродство каротиноида к протону.

3.5.1 Влияние белкового окружения на энергию переноса протона на каротиноид

Вдоль содержащего каротиноид кармана ОСР существует градиент электростатического поля, созданного боковыми остатками аминокислот (Рис. 3.15). Положительный полюс этого градиента расположен в С-доме белка (в окрестности водородных связей с тирозином и триптофаном), а отрицательный в N-доме. Дополнительный вклад в отрицательный потенциал в С-доме может вносить ион хлора, который по данным ряда кристаллических структур находится в полости белка на расстоянии порядка 5 Å от С9 атома каротиноида.

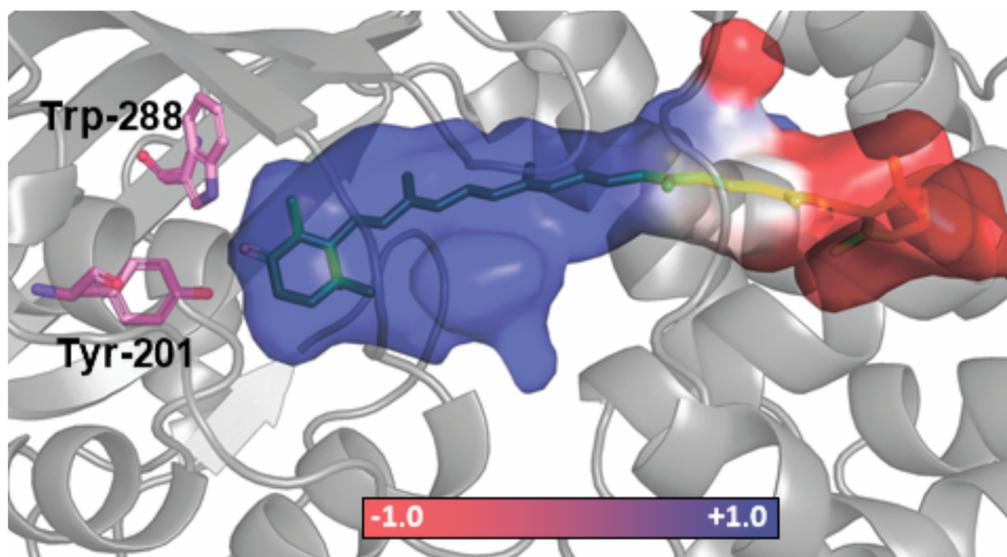


Рисунок 3.15. Распределение электростатического потенциала на поверхности каротиноид-содержащей полости белка ОСР. Распределение построено в результате параметризации модели 3MG1 с помощью силового поля CHARMM [Lindahl и др., 2010]. Визуализация относительного значения электростатического потенциала на поверхности каротиноид-содержащего кармана осуществлена с помощью плагина APBS Tools 2.1 в PyMol.

Для того чтобы оценить влияние электростатического поля, созданного белком, на $E_{НА}$ акцептора протона (каротиноида) и донора протона (молекулярного комплекса тирозина и триптофана), были проведены расчеты САМ-ВЗЛР/D3/6-311G++** соответствующих РА при учете взаимной ориентации кофакторов (в данном случае аминокислоты Y201 и W288 относятся к кофакторам) и белкового окружения.

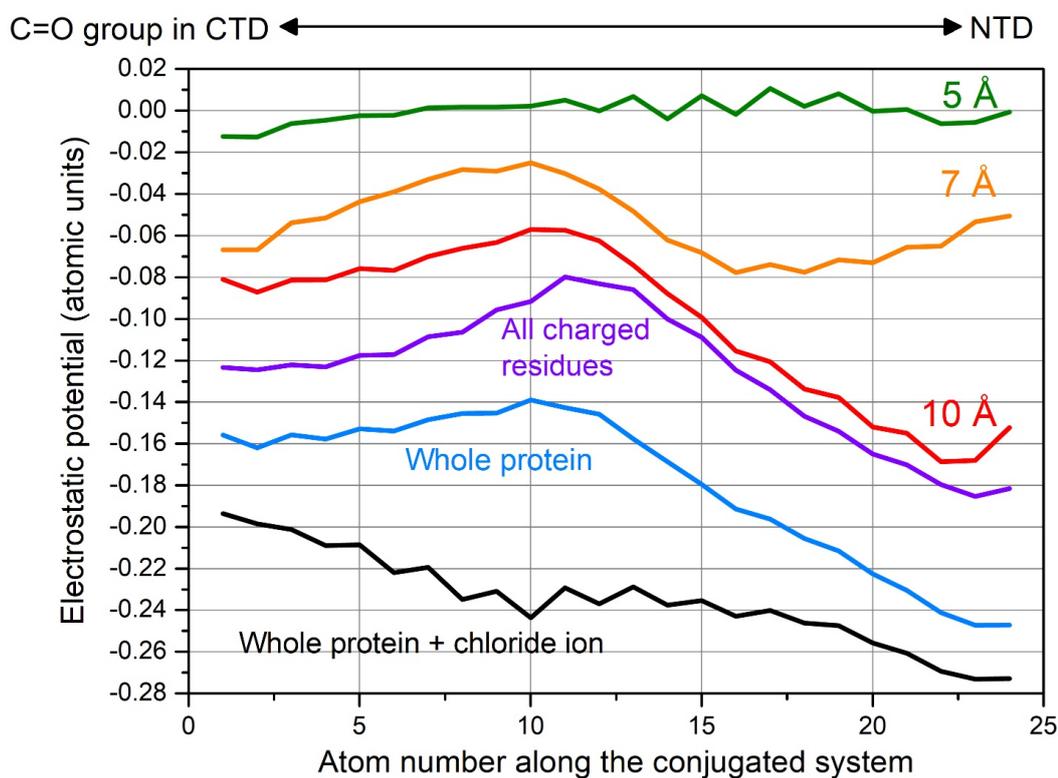


Рисунок 3.16. Распределение электростатического потенциала вдоль сопряженной цепи каротиноида в белковом кармане ОСР. Кривые соответствуют значениям потенциала на ядрах сопряженной цепи кето-каротиноида, наведенного атомами белка, расположенными на расстоянии 5 Å (зеленая линия), 7 Å (оранжевая линия), 10 Å (красная линия), всеми заряженными аминокислотами (фиолетовая линия), всеми атомами белка (синяя линия), всеми атомами белки и ионом хлора в полости белка (черная линия).

Белок, создающий электростатический потенциал в кармане, связывающем каротиноид, был учтен в качестве точечных зарядов вокруг каротиноида и комплекса тирозин-триптофан. Параметризация точечных зарядов модели ЗМГ1 произведена с помощью силового поля CHARMM [Lindahl и др., 2010] при рН 7.0. Перед расчетом сродства проведена оптимизация геометрии каротиноида и аминокислотных остатков в поле точечных зарядов. При оптимизации геометрии для каротиноида были зафиксированы координаты центра масс, кето-кислорода и атомов С6 и С6', для аминокислот были зафиксированы тяжелые атомы аминокислотного остова. Сродство к протону рассчитано в рамках САМ-ВЗЛР/D3/6-311G++**

для моделей, учитывающих: только заряженные аминокислоты белка «only charged AA»; все аминокислоты белка «all AA»; а также варианты, содержащие точечный заряд, отвечающий иону хлора «only charged AA + Cl⁻» и «all AA + Cl⁻» соответственно (Таблица 3.9).

Проведенные расчеты указывают на значительное снижение энергии, необходимой для переноса протона от комплекса тирозин-триптофан на каротиноид, при учете локального окружения белка. При этом заряженные аминокислоты вносят в снижение вклад порядка 20 кДж/моль, а ион хлора порядка 40 кДж/моль.

На основании проведенного исследования сделан вывод о том, что в ходе фотоактивации благодаря электростатическому полю внутри белкового кармана, содержащего каротиноид, возможен разрыв водородной связи по ионному механизму с образованием протонированной формы кето-каротиноида (Рис. 3.17).

Таблица 3.9. Вычисленное сродство к протону эхиненона (ECN) и комплекса тирозина и триптофана (Tyr-Trp complex) в вакууме («Вакуум») и модельных потенциалах точечных зарядов, соответствующих только заряженным аминокислотам белка OCP («Только заряженные АК»), заряженными аминокислотами и ионом хлора («Только заряженные АК + Cl⁻»), всеми аминокислотами OCP («Все АК»), всеми аминокислотами и ионом хлора («Все АК + Cl⁻»).

Соединение	Сродство к протону, абсолютное значение (PA_{compound}), кДж/моль	ΔPA ($PA_{\text{ECN}} - PA_{\text{Tyr-Trp}}$), кДж/моль
Вакуум		
ECN	1021	356
Tyr-Trp complex	1377	
Только заряженные АК		
ECN	1384	331
Tyr-Trp complex	1715	
Только заряженные АК + Cl⁻		
ECN	1506	293
Tyr-Trp complex	1799	
Все АК		
ECN	1481	-33
Tyr-Trp complex	1447	
Все АК + Cl⁻		
ECN	1615	-84
Tyr-Trp complex	1531	

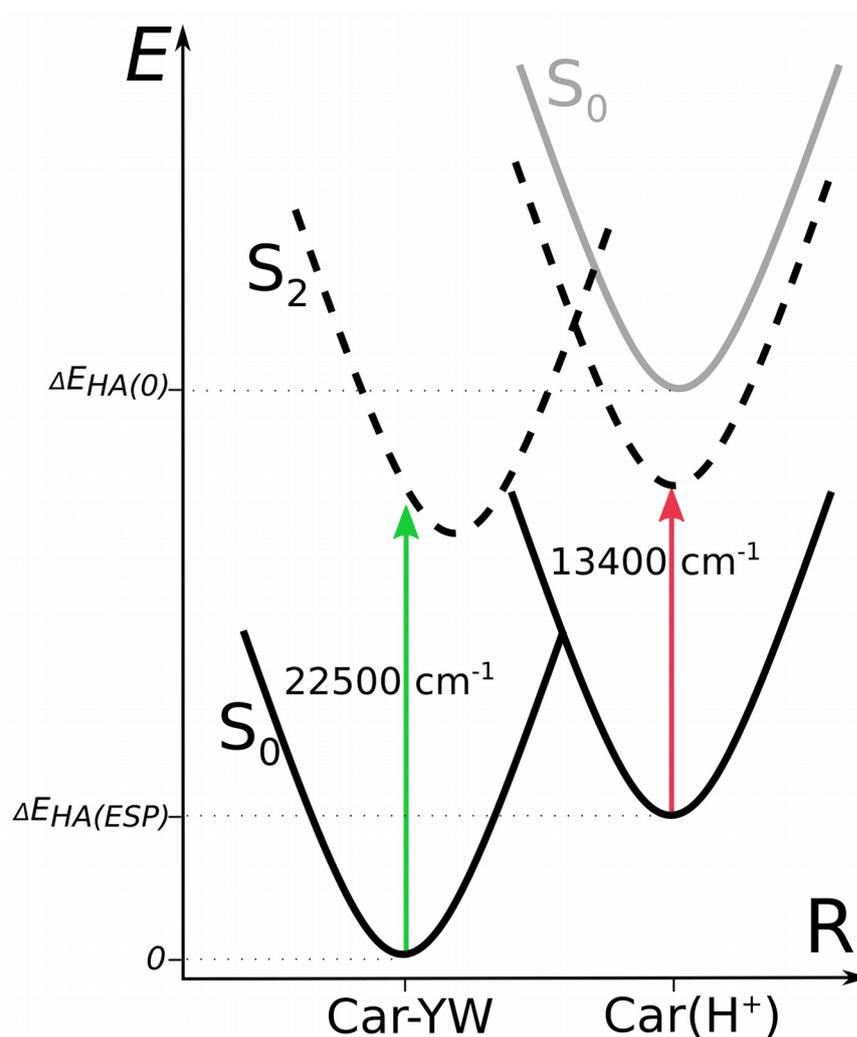


Рисунок 3.17. Энергетическая диаграмма реакции переноса протона на каротиноид в ходе фотовозбуждения ОСР. Диаграмма содержит два электронных состояния: S_0 (сплошные линии) и S_2 (пунктирные линии). Вертикальные стрелки изображают энергию вертикального возбуждения. Стартовому состоянию соответствует основное электронное состояние S_0 каротиноида, связанного водородными связями с остатками тирозина и триптофана Car-YW. Относительная энергия ΔE_{HA} протонированной формы каротиноида Car(H^+) зависит от внешнего электростатического поля. В отсутствии внешнего поля энергии возбуждения (зеленая стрелка) не достаточно, чтобы компенсировать энергию $\Delta E_{HA}(0)$, необходимую для переноса протона на каротиноид (состоянию каротиноида с перенесенным протоном в отсутствии внешнего поля соответствует серая линия). Внешнее электростатическое поле способно уменьшить разницу между стартовым состоянием и состоянием с перенесенным протоном $\Delta E_{HA}(ESP)$, что делает перенос энергетически возможным.

4. Заключение

Неактивная темновая форма ОСР_о стабильна благодаря наличию водородных связей между боковыми остатками тирозина и триптофана и кетогруппой каротиноида. Именно это взаимодействие удерживает боковую циклическую группу каротиноида в транс-положении, не давая ей перейти в более выгодную энергетически цис-конформацию. В работе рассмотрены альтернативные пути фотодиссоциации водородных связей на поверхности возбужденного состояния S₂. Классический механизм разрыва водородной связи (Рис. 4 верхняя панель и Рис. 3.10 Координата А) энергетически возможен, но представляется нам маловероятным. В качестве альтернативы рассмотрен механизм разрыва водородной связи по ионному механизму, в результате которого протон переходит от аминокислот (донора протона) к молекуле каротиноида (акцептора протона) и образуется анион-катионная пара (Рис. 4 нижняя панель и Рис. 3.10 Координата В). Образование такой пары становится возможным благодаря электростатическому потенциалу, созданному белковым окружением (Рис. 3.13 и 3.14), градиент которого увеличивает относительное сродство к протону кетогруппы каротиноида (Таблица 3.9).

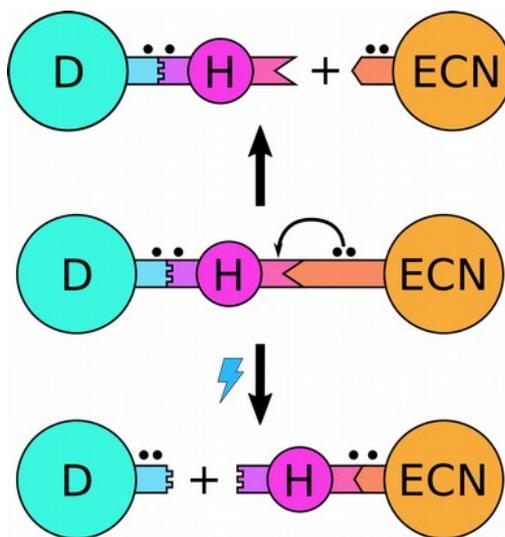


Рисунок 4. Символическая схема, иллюстрирующая исследованные в работе механизмы фотодиссоциации водородной связи в белке ОСР. D — донор протона водородной связи; H — ядро водорода; ECN — кето-каротиноид; точки символизируют валентную (левая) и неподеленную пару электронов водородной связи.

Выводы

1. Компактная неактивированная форма ОСРо стабильна за счет образования водородных связей между кетогруппой каротиноида и аминокислотными остатками тирозина и триптофана, расположенными в С-домене. Энергия этих связей может достигать 50-70 кДж/моль (в геометрическом оптимуме), но в белке из-за стерических взаимодействий, приводящих к деформации связи, эта энергия снижается до 20 кДж/моль;

2. Рассчитан барьер цис-транс изомеризации, который составляет 140 кДж/моль для псевдо-двойных и 40 кДж/моль для псевдо-одинарных связей. Показано, что наличие бокового цикла кето-каротиноида уменьшает барьер вращения этой группы по отношению к остальной сопряженной цепи до 15 кДж/моль;

3. Вращение каротиноида вокруг псевдо-одинарных связей приводит к сдвигу полосы его оптического поглощения в синюю область, а вращение каротиноида вокруг псевдо-двойных связей приводит к сдвигу полосы в красную область;

4. Вычисленный гипсохромный сдвиг для каротиноида, связанного с ОСРо составляет 1600 см^{-1} , а для каротиноида в составе ОСРг 460 см^{-1} . Эта разница и соответствует относительному батохромному сдвигу спектра поглощения ОСРг по сравнению с ОСРо на 1140 см^{-1} ;

5. Образование протонированной катионной формы кето-каротиноида приводит к существенному батохромному сдвигу спектра поглощения пигмента, что указывает на существенное увеличение сродства к протону этого пигмента на поверхности потенциальной энергии состояния S₂;

6. Предложен механизм разрыва водородной связи в ОСР с переносом протона от аминокислотных остатков на кетогруппу каротиноида;

7. Энергия, необходимая для переноса протона от аминокислотных остатков тирозина и триптофана на кетогруппу каротиноида, зависит от локального белкового окружения. Электростатический потенциал, который создан аминокислотными остатками в гидрофобном кармане ОСР, делает энергетически возможной реакцию переноса протона на каротиноид.

Список рецензированных работ, опубликованных автором по теме диссертации

Основные публикации Ярошевича Игоря Александровича по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.02 - «Биофизика»:

1. Yaroshevich I. A., Krasilnikov P. M., Rubin A. B. Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations //Computational and Theoretical Chemistry. – 2015. – Т. 1070. – С. 27-32. **IF 1.363**

2. Maksimov E.G., Yaroshevich I.A., Tsoraev G.V., Sluchanko N.N., Slutsкая E.A., Shamborant O.G., ... & Stepanov A.V. A genetically encoded fluorescent temperature sensor derived from the photoactive Orange Carotenoid Protein //Scientific reports. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-9. **IF 4.122**

3. Pishchalnikov R.Y., Yaroshevich I.A., Slastnikova T.A., Ashikhmin A.A., Stepanov A.V., Slutsкая E.A., ... & Maksimov E.G. Structural peculiarities of keto-carotenoids in water-soluble proteins revealed by simulation of linear absorption //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2019. – Т. 21. – №. 46. – С. 25707-25719. **IF 3.963**

4. Maksimov E.G., Protasova E.A., Tsoraev G.V., Yaroshevich I.A., Maydykovskiy A.I., Shirshin E.A., ... & Sluchanko N.N. Probing of carotenoid-tryptophan hydrogen bonding dynamics in the single-tryptophan photoactive Orange Carotenoid Protein ///Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-12. **IF 4.122**

Статья в сборнике, индексируемом в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

1. Pishchalnikov R. Y., Yaroshevich I. A. et al. Orange Carotenoid Protein Absorption Spectra Simulation Using the Differential Evolution Algorithm //Russian Supercomputing Days. – Springer, Cham, 2019. – С. 302-312.

Список литературных источников

1. Siefermann-Harms D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes // *Physiol. Plant.* 1987. Т. 69. № 3. С. 561–568.
2. Weesie R.J. и др. ^{13}C Magic Angle Spinning NMR Analysis and Quantum Chemical Modeling of the Bathochromic Shift of Astaxanthin in α -Crustacyanin, the Blue Carotenoprotein Complex in the Carapace of the Lobster *Homarus gammarus* // *Biochemistry.* 1997. Т. 36. № 24. С. 7288–7296.
3. Purcell W.P., Singer J.A. A brief review and table of semiempirical parameters used in the Hueckel molecular orbital method // *J. Chem. Eng. Data.* 1967. Т. 12. № 2. С. 235–246.
4. Cerezo J. и др. Antioxidant Properties of β -Carotene Isomers and Their Role in Photosystems: Insights from Ab Initio Simulations // *J. Phys. Chem. A.* 2012. Т. 116. № 13. С. 3498–3506.
5. Hapiot P. и др. Single Two-Electron Transfers vs Successive One-Electron Transfers in Polyconjugated Systems Illustrated by the Electrochemical Oxidation and Reduction of Carotenoids // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. Т. 123. № 27. С. 6669–6677.
6. Martins J.B.L. и др. Theoretical investigation of carotenoid ultraviolet spectra // *Int. J. Quantum Chem.* 2009. Т. 109. № 4. С. 739–745.
7. Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model // *J. Chem. Phys.* 1999. Т. 110. № 13. С. 6158–6170.
8. Andersson P.O. и др. ABSORPTION SPECTRAL SHIFTS OF CAROTENOIDS RELATED TO MEDIUM POLARIZABILITY // *Photochem. Photobiol.* 1991. Т. 54. № 3. С. 353–360.
9. Andersson P.O. и др. Dual singlet state emission in a series of mini-carotenes // *J. Lumin.* 1992.
10. Balevičius Jr V. и др. The full dynamics of energy relaxation in large organic molecules: from photo-excitation to solvent heating // *Chem. Sci.* 2019. Т. 10. № 18. С. 4792–4804.
11. Bandara S. и др. Photoactivation mechanism of a carotenoid-based photoreceptor // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017. Т. 114. № 24. С. 6286–6291.
12. Bao H. и др. Additional families of orange carotenoid proteins in the photoprotective system of cyanobacteria // *Nat. Plants.* 2017. Т. 3.
13. Bao H., Melnicki M.R., Kerfeld C.A. Structure and functions of Orange Carotenoid Protein homologs in cyanobacteria // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2017. Т. 37. № April. С. 1–9.
14. Becke A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior // *Phys. Rev. A.* 1988. Т. 38. № 6. С. 3098–3100.
15. Berera R. и др. The photophysics of the orange carotenoid protein, a light-powered molecular switch // *J. Phys. Chem. B.* 2012.
16. Berera R. и др. Excited states of the inactive and active forms of the orange carotenoid protein // *J. Phys. Chem. B.* 2013. Т. 117. № 31. С. 9121–9128.

17. Bernhard K. и др. Carotenoids of the Carotenoprotein Asteriarubin. Optical Purity of Asterinic Acid // *Helv. Chim. Acta*. 1982.
18. Bhosale P. и др. Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye // *J. Biol. Chem.* 2004.
19. Bondanza M. и др. The Multiple Roles of the Protein in the Photoactivation of Orange Carotenoid Protein // *Chem.* 2020. Т. 6. № 1. С. 187–203.
20. Boulay C. и др. Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Т. 107. № 25. С. 11620–11625.
21. Britton G. и др. CAROTENOPROTEINS / под ред. G. BRITTON, T.W.B.T.-C.C. and B. GOODWIN. : Pergamon, 1982. С. 237–251.
22. Britton G. и др. Carotenoid blues: structural studies on carotenoproteins // *Pure Appl. Chem.* 1997.
23. Britton G. Carotenoids Handbook. , 2004.
24. Britton G., Helliwell J.R. Carotenoid-Protein Interactions BT - Carotenoids: Volume 4: Natural Functions / под ред. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. Basel: Birkhäuser Basel, 2008. С. 99–118.
25. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids - Volume 4: Natural functions // *Carotenoids*. , 2009.
26. Bulat F.A. и др. Density-functional theory (hyper)polarizabilities of push-pull π -conjugated systems: Treatment of exact exchange and role of correlation // *J. Chem. Phys.* 2005. Т. 123. № 1. С. 14319.
27. Busch P., Heinonen T., Lahti P. Heisenberg's uncertainty principle // *Phys. Rep.* 2007. Т. 452. № 6. С. 155–176.
28. Carbon C.B. De и др. Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in *Escherichia coli* // *Sci. Rep.* 2015.
29. Carrillo C. и др. Role of structural barriers in the in vitro bioaccessibility of anthocyanins in comparison with carotenoids // *Food Chem.* 2017. Т. 227. С. 271–279.
30. Casida M.E. Propagator corrections to adiabatic time-dependent density-functional theory linear response theory // *J. Chem. Phys.* 2005.
31. Casida M.E., Huix-Rotllant M. Progress in time-dependent density-functional theory // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2012.
32. Catalán J., Paz J.L.G. De. On the ordering of the first two excited electronic states in all-trans linear polyenes On the ordering of the first two excited electronic states in all-trans linear polyenes // 2004.

33. Chai J.-D., Head-Gordon M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008. Т. 10. № 44. С. 6615–6620.
34. Champagne B. и др. Assessment of Conventional Density Functional Schemes for Computing the Dipole Moment and (Hyper)polarizabilities of Push–Pull π -Conjugated Systems // *J. Phys. Chem. A.* 2000. Т. 104. № 20. С. 4755–4763.
35. Chayen N.E. и др. Unravelling the structural chemistry of the colouration mechanism in lobster shell // *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* 2003.
36. Cheesman D.F. и др. Purification and properties of crustacyanin // *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* 1966. Т. 164. № 994. С. 130–151.
37. CHEESMAN D.F. Ovorubin, a chromoprotein from the eggs of the gastropod mollusc *Pomacea canaliculata*. // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1958.
38. Christensen R.L. и др. Linear polyenes: models for the spectroscopy and photophysics of carotenoids. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. Т. 430. № 1. С. 30–6.
39. Cianci M. и др. Structure of lobster apocrustacyanin A1 using softer X-rays // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2001.
40. Cianci M. и др. The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β -Crustacyanin at 3.2-Å resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Т. 99. № 15. С. 9795 LP – 9800.
41. Clark R.J.H. и др. The carotenoproteins of the starfish *Linckia laevigata* (Echinodermata: asteroidea): A resonance raman and circular dichroism study // *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 1990. Т. 95. № 4. С. 847–853.
42. Clark R.J.H., D'Urso N.R., Zagalsky P.F. Excitation Profiles, Absorption and Resonance Raman Spectra of the Carotenoprotein Ovorubin, and a Resonance Raman Study of Some Other Astaxanthin Proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 1980.
43. Clevidence B.A., Bieri J.G. Association of Carotenoids with Human Plasma Lipoproteins // *Methods Enzymol.* 1993.
44. Combes J.M., Duclos P., Seiler R. The Born-Oppenheimer Approximation // *Rigorous Atomic and Molecular Physics.* , 1981.
45. Conn P.F., Schalch W., Truscott T.G. The singlet oxygen and carotenoid interaction // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 1991. Т. 11. № 1. С. 41–47.
46. Daddy S. и др. A novel high light-inducible carotenoid-binding protein complex in the thylakoid membranes of *Synechocystis* PCC 6803 // *Sci. Rep.* 2015. Т. 5.
47. Demmig-Adams B., Gilmore A.M., Adams W.W. Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. // *FASEB J.* 1996.
48. Dilbeck P.L. и др. Quenching Capabilities of Long-Chain Carotenoids in Light-Harvesting-2 Complexes from *Rhodobacter sphaeroides* with an Engineered Carotenoid Synthesis Pathway // *J. Phys. Chem. B.* 2016. Т. 120. № 24. С. 5429–5443.

49. Ditchfield R., Hehre W.J., Pople J.A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules // *J. Chem. Phys.* 1971. T. 54. № 2. С. 724–728.
50. Dreuw A. Influence of geometry relaxation on the energies of the S1 and S2 states of violaxanthin, zeaxanthin, and lutein // *J. Phys. Chem. A.* 2006. T. 110. № 13. С. 4592–4599.
51. Dreuw A., Fleming G.R., Head-Gordon M. Chlorophyll fluorescence quenching by xanthophylls // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003.
52. Durig J.R., Church J.S., Compton D.A.C. Low frequency vibrational spectra and internal rotation of 2-chlorobuta-1,3-diene, propenoyl fluoride, and propenoyl chloride // *J. Chem. Phys.* 1979. T. 71. № 3. С. 1175–1182.
53. Elgsaeter A., Tauber J.D., Liaaen-Jensen S. Animal carotenoids 15. Carotenoid distribution and carotenoprotein of *Asterias rubens* // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1978.
54. Enriquez M.M. и др. The Intramolecular Charge Transfer State in Carbonyl-Containing Polyenes and Carotenoids // *J. Phys. Chem. B.* 2010. T. 114. № 38. С. 12416–12426.
55. Epstein S. *The variation method in quantum chemistry.* : Elsevier Science, 2012.
56. Fabiola F. и др. An improved hydrogen bond potential: Impact on medium resolution protein structures // *Protein Sci.* 2002. T. 11. № 6. С. 1415–1423.
57. Fateley W.G. и др. Torsional frequencies in the far infrared—IV. Torsions around the C-C single bond in conjugated molecules // *Spectrochim. Acta.* 1965. T. 21. № 2. С. 231–244.
58. Firefly C. *Firefly 8.0.0 manual* // 2013.
59. Foldy L.L. Antisymmetric Functions and Slater Determinants // *J. Math. Phys.* 1962. T. 3. № 3. С. 531–539.
60. Frank H.A. и др. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis // *Photosynth. Res.* 1994.
61. Frank H.A. и др. On the photophysics and photochemical properties of carotenoids and their role as light-harvesting pigments in photosynthesis // *Pure Appl. Chem.* 1997.
62. Frank H.A. и др. Effect of the Solvent Environment on the Spectroscopic Properties and Dynamics of the Lowest Excited States of Carotenoids // *J. Phys. Chem. B.* 2000. T. 104. № 18. С. 4569–4577.
63. Frank H.A. Spectroscopic Studies of the Low-Lying Singlet Excited Electronic States and Photochemical Properties of Carotenoids // *Arch. Biochem. Biophys.* 2001. T. 385. № 1. С. 53–60.
64. Ghosh D. и др. Orbital optimization in the density matrix renormalization group, with applications to polyenes and β -carotene // *J. Chem. Phys.* 2008. T. 128. № 14. С. 144117.
65. Gorbunov M.Y. и др. A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2011. T. 1807. № 12. С. 1591–1599.

66. Gordon E.J. и др. The C1 subunit of α -crustacyanin: the de novo phasing of the crystal structure of a 40kDa homodimeric protein using the anomalous scattering from S atoms combined with direct methods // *Acta Crystallogr. Sect. D*. 2001. T. 57. № 9. С. 1230–1237.
67. Götze J.P. Vibrational Relaxation in Carotenoids as an Explanation for Their Rapid Optical Properties // *J. Phys. Chem. B*. 2019.
68. Götze J.P., Thiel W. TD-DFT and DFT/MRCI study of electronic excitations in Violaxanthin and Zeaxanthin // *Chem. Phys.* 2013. T. 415. С. 247–255.
69. Granovsky A. a. Extended multi-configuration quasi-degenerate perturbation theory: the new approach to multi-state multi-reference perturbation theory. // *J. Chem. Phys.* 2011. T. 134. № 21. С. 214113.
70. Grimme S. и др. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu // *J. Chem. Phys.* 2010.
71. Grimme S., Neese F. Double-hybrid density functional theory for excited electronic states of molecules // *J. Chem. Phys.* 2007. T. 127. № 15. С. 154116.
72. Gross E.K.U., Kohn W. Time-dependent density-functional theory // *Adv. Quantum Chem.* 1990.
73. Guo W.H., Tu C.Y., Hu C.H. Cis-trans isomerizations of β -carotene and lycopene: A theoretical study // *J. Phys. Chem. B*. 2008. T. 112. № 38. С. 12158–12167.
74. Gupta S. и др. Local and global structural drivers for the photoactivation of the orange carotenoid protein // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. T. 112. № 41. С. E5567–E5574.
75. Gutowski M., Chałasiński G. Critical evaluation of some computational approaches to the problem of basis set superposition error // *J. Chem. Phys.* 1993.
76. Gwizdala M., Wilson A., Kirilovsky D. In Vitro Reconstitution of the Cyanobacterial Photoprotective Mechanism Mediated by the Orange Carotenoid Protein in *Synechocystis* PCC 6803 // *Plant Cell*. 2011. T. 23. № 7. С. 2631–2643.
77. Hashimoto H. и др. Molecular structures of carotenoids as predicted by MNDO-AM1 molecular orbital calculations // *J. Mol. Struct.* 2002. T. 604. № 2. С. 125–146.
78. Hashimoto H. и др. Understanding/unravelling carotenoid excited singlet states // *J. R. Soc. Interface*. 2018. T. 15. № 141. С. 20180026.
79. Havaux M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts // *Trends Plant Sci.* 1998.
80. Hehre W.J. Ab initio molecular orbital theory // *Acc. Chem. Res.* 1976. T. 9. № 11. С. 399–406.
81. Hehre W.J., Ditchfield R., Pople J.A. Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules // *J. Chem. Phys.* 1972. T. 56. № 5. С. 2257–2261.
82. Hempel J. и др. Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2016. T. 317. С. 161–174.

83. Hirata S., Head-Gordon M. Time-dependent density functional theory within the Tamm–Dancoff approximation // *Chem. Phys. Lett.* 1999. T. 314. № 3. С. 291–299.
84. Hofmann E. и др. Structural Basis of Light Harvesting by Carotenoids: Peridinin-Chlorophyll-Protein from *Amphidinium carterae* // *Science* (80-.). 1996. T. 272. № 5269. С. 1788 LP – 1791.
85. Hohenberg P., Kohn W. Inhomogeneous electron gas // *Phys. Rev.* 1964.
86. Hudson B.S., Kohler B.E. A low-lying weak transition in the polyene α,ω -diphenyloctatetraene // *Chem. Phys. Lett.* 1972. T. 14. № 3. С. 299–304.
87. Hudson B.S., Kohler B.E., Schulten K. Linear Polyene Electronic Structures and Potential Surfaces // *Excited States*. 1982. T. 6. № 1. С. 1–95.
88. Илаган Р.Р. и др. Femtosecond Time-Resolved Absorption Spectroscopy of Astaxanthin in Solution and in α -Crustacyanin // *J. Phys. Chem. A*. 2005. T. 109. № 14. С. 3120–3127.
89. Josue J.S., Frank H.A. Direct determination of the S1 excited-state energies of Xanthophylls by low-temperature fluorescence spectroscopy // *J. Phys. Chem. A*. 2002.
90. Jyonouchi H. и др. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action // *Nutr. Cancer*. 2000.
91. Kaczor A., Baranska M. Structural Changes of Carotenoid Astaxanthin in a Single Algal Cell Monitored in Situ by Raman Spectroscopy // *Anal. Chem.* 2011. T. 83. № 20. С. 7763–7770.
92. Kay Holt T., Krogmann D.W. A carotenoid-protein from cyanobacteria // *BBA - Bioenerg.* 1981.
93. Ke B.B.T.-M. in E. [60] Carotenoproteins // *Photosynthesis and Nitrogen Part A. : Academic Press*, 1971. С. 624–636.
94. KEEN J.N. и др. Complete sequence and model for the A2 subunit of the carotenoid pigment complex, crustacyanin // *Eur. J. Biochem.* 1991a. T. 197. № 2. С. 407–417.
95. KEEN J.N. и др. Complete sequence and model for the C1 subunit of the carotenoprotein crustacyanin, and model for the dimer, β -crustacyanin, formed from the C1 and A2 subunits with astaxanthin // *Eur. J. Biochem.* 1991b. T. 202. № 1. С. 31–40.
96. Kendall R.A., Dunning T.H., Harrison R.J. Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions // *J. Chem. Phys.* 1992.
97. Kerfeld C.A. и др. The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein // *Structure*. 2003.
98. Kerfeld C.A. и др. Structure, function and evolution of the cyanobacterial orange carotenoid protein and its homologs // *New Phytol.* 2017.
99. Kildahl-Andersen G., Frode Lutnaes B., Liaaen-Jensen S. Protonated canthaxanthins as models for blue carotenoproteins // *Org. Biomol. Chem.* 2004.
100. King J.D. и др. Chemical activation of the cyanobacterial orange carotenoid protein // *FEBS Lett.* 2014.

101. Kirilovsky D. Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism // *Photosynth. Res.* 2007. Т. 93. № 1. С. 7.
102. Kirilovsky D., Kerfeld C.A. Cyanobacterial photoprotection by the orange carotenoid protein // *Nat. Plants.* 2016.
103. Kish E. и др. Echinenone vibrational properties: From solvents to the orange carotenoid protein // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2015. Т. 1847. № 10. С. 1044–1054.
104. Kohler B.E. *Electronic Properties of Linear Polyenes BT - Conjugated Polymers: The Novel Science and Technology of Highly Conducting and Nonlinear Optically Active Materials* / под ред. J.L. Brédas, R. Silbey. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. С. 405–434.
105. Kohler B.E. Octatetraene Photoisomerization // *Chem. Rev.* 1993. Т. 93. № 1. С. 41–54.
106. Köhn S. и др. *Aggregation and Interface Behaviour of Carotenoids BT - Carotenoids: Volume 4: Natural Functions* / под ред. G. Britton, S. Liaen-Jensen, H. Pfander. Basel: Birkhäuser Basel, 2008. С. 53–98.
107. Kohn W., Sham L.J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects // *Phys. Rev.* 1965.
108. Konold P.E. и др. Photoactivation Mechanism, Timing of Protein Secondary Structure Dynamics and Carotenoid Translocation in the Orange Carotenoid Protein // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Т. 141. № 1. С. 520–530.
109. Konovalov V. V., Kispert L.D. AM1, INDO/S and optical studies of carbocations of carotenoid molecules. Acid induced isomerization // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1999.
110. Korczynski M. и др. Ultrafast transient lens spectroscopy of various C40 carotenoids: Lycopene, β -carotene, (3R,3' R)-zeaxanthin, (3R,3' R,6' R)-lutein, echinenone, canthaxanthin, and astaxanthin // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005.
111. Körzdörfer T., Brédas J.-L. *DFT 101 and Applications to π -Conjugated Systems* // *The WSPC Reference on Organic Electronics: Organic Semiconductors Materials and Energy.* : WORLD SCIENTIFIC, 2016. С. 19–52.
112. Kosumi D. и др. Ultrafast relaxation kinetics of the dark S1 state in all-trans- β -carotene explored by one- and two-photon pump–probe spectroscopy // *Chem. Phys.* 2010. Т. 373. № 1. С. 33–37.
113. Kovachy T. и др. Quantum superposition at the half-metre scale // *Nature.* 2015. Т. 528. № 7583. С. 530–533.
114. Kuznetsova V. и др. Comparative ultrafast spectroscopy and structural analysis of OCP1 and OCP2 from *Tolypothrix* // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2019. С. 148120.
115. Labello N.P., Ferreira A.M., Kurtz H.A. Correlated, relativistic, and basis set limit molecular polarizability calculations to evaluate an augmented effective core potential basis set // *International Journal of Quantum Chemistry.* , 2006.

116. Labello N.P., Ferreira A.M., Tcurtz H.A. An augmented effective core potential basis set for the calculation of molecular polarizabilities // *J. Comput. Chem.* 2005.
117. Landrum J.T. и др. The conformation of end-groups is one determinant of carotenoid topology suitable for high fidelity molecular recognition: A study of β - and ϵ -end-groups // *Arch. Biochem. Biophys.* 2010. Т. 493. № 2. С. 169–174.
118. Landrum J.T., Bone R.A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment // *Arch. Biochem. Biophys.* 2001.
119. Lasaga A.C., Aerni R.J., Karplus M. Photodynamics of polyenes: The effect of electron correlation on potential surfaces // *J. Chem. Phys.* 1980. Т. 73. № 10. С. 5230–5243.
120. Lechno-Yossef S. и др. Synthetic OCP heterodimers are photoactive and recapitulate the fusion of two primitive carotenoproteins in the evolution of cyanobacterial photoprotection // *Plant J.* 2017.
121. Lee I., Lee S. Excited-State Dynamics of Carotenoids Studied by Femtosecond Transient Absorption Spectroscopy // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2014. Т. 35. № 3. С. 851–857.
122. Lee J., Koo N., Min D.B. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2004.
123. Lee M. и др. Extended Hückel and Slater's rule initial guess for real space grid-based density functional theory // *Comput. Theor. Chem.* 2015. Т. 1062. С. 24–29.
124. Leverenz R.L. и др. A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection // *Science (80-.).* 2015.
125. Li B., Vachali P., Bernstein P.S. Human ocular carotenoid-binding proteins // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010.
126. Li Q., Yong Z., Zeng Y. The Static (Hyper) Polarizabilities of Push-Pull Polyenes: A Theoretic Study // *Asian J. Chem. Sci.* 2018.
127. Li X.D. и др. Optimization of expression of orange carotenoid protein in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* 2019.
128. Liaaen-Jensen S. Stereochemical aspects of carotenoids // *Pure Appl. Chem.* 1997.
129. Lindahl E. и др. Implementation of the charmm force field in GROMACS: Analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models // *J. Chem. Theory Comput.* 2010.
130. Lintig J. von и др. The biochemical and structural basis for trans-to-cis isomerization of retinoids in the chemistry of vision // *Trends Biochem. Sci.* 2010.
131. Lintig J. Von. Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology // *Am. J. Clin. Nutr.* 2012.
132. Liu H. и др. Dramatic Domain Rearrangements of the Cyanobacterial Orange Carotenoid Protein upon Photoactivation // *Biochemistry.* 2016. Т. 55. № 7. С. 1003–1009.

133. Liu W. и др. Effect of beta-Ring Rotation on the Structures and Vibrational Spectra of beta-Carotene : Density Functional Theory Analysis // *J. Phys. Chem. A*. 2008. Т. 112. С. 10580–10585.
134. Llansola-Portoles M.J., Pascal A.A., Robert B. Electronic and vibrational properties of carotenoids: from in vitro to in vivo // *J. R. Soc. Interface*. 2017. Т. 14. № 135. С. 20170504.
135. López-Igual R. и др. Different Functions of the Paralogs to the N-Terminal Domain of the Orange Carotenoid Protein in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Plant Physiol*. 2016. Т. 171. № 3. С. 1852 LP – 1866.
136. Lu Y. и др. Native mass spectrometry analysis of oligomerization states of fluorescence recovery protein and orange carotenoid protein: Two proteins involved in the cyanobacterial photoprotection cycle // *Biochemistry*. 2017.
137. Lukeš V. и др. Electronic ground state conformers of β -carotene and their role in ultrafast spectroscopy // *Chem. Phys. Lett*. 2011. Т. 506. № 1. С. 122–127.
138. Maitra N.T. и др. Double excitations within time-dependent density functional theory linear response // *J. Chem. Phys*. 2004.
139. Maksimov E.G. и др. A comparative study of three signaling forms of the orange carotenoid protein // *Photosynth. Res*. 2016.
140. Maksimov E.G. и др. The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components // *Sci. Rep*. 2017. Т. 7. № 1. С. 15548.
141. Maksimov G. V и др. Investigation of carotenoid conformations in myelin nerve upon changes in oxygen content // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2007. Т. 417. № 1. С. 324–326.
142. Marian C.M., Gilka N. Performance of the density functional theory/multireference configuration interaction method on electronic excitation of extended π -systems // *J. Chem. Theory Comput*. 2008. Т. 4. № 9. С. 1501–1515.
143. Marín-Medina N. и др. Mechanical properties that influence antimicrobial peptide activity in lipid membranes // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016.
144. Marques M.A.L., Gross E.K.U. Time-dependent density functional theory // *Annu. Rev. Phys. Chem*. 2004.
145. Matthews S.J. и др. Astaxanthin binding protein in Atlantic salmon // *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol*. 2006.
146. Melnicki M.R. и др. Structure, Diversity, and Evolution of a New Family of Soluble Carotenoid-Binding Proteins in Cyanobacteria // *Mol. Plant*. 2016.
147. Meneghin E. и др. Coherence in carotenoid-to-chlorophyll energy transfer // *Nat. Commun*. 2018. Т. 9. № 1. С. 3160.
148. Milián-Medina B., Gierschner J. π -Conjugation // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci*. 2012. Т. 2. № 4. С. 513–524.

149. Milicua J.C.G. и др. Isolation of a yellow carotenoprotein from carrot // *Phytochemistry*. 1991.
150. Miller N.J. и др. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls // *FEBS Lett*. 1996.
151. Mori Y. Computational study on the color change of 3'-hydroxyechinenone in the orange carotenoid protein // *Chem. Phys. Lett*. 2016. T. 652. С. 184–189.
152. Navara K.J., Hill G.E. Dietary carotenoid pigments and immune function in a songbird with extensive carotenoid-based plumage coloration // *Behav. Ecol*. 2003.
153. Neese F. The ORCA program system // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci*. 2012. T. 2. № 1. С. 73–78.
154. Niedzwiedzki D.M. и др. Functional characteristics of spirilloxanthin and keto-bearing Analogues in light-harvesting LH2 complexes from *Rhodobacter sphaeroides* with a genetically modified carotenoid synthesis pathway // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg*. 2015.
155. Niedzwiedzki D.M. и др. Carotenoid-induced non-photochemical quenching in the cyanobacterial chlorophyll synthase-HliC/D complex // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg*. 2016. T. 1857. № 9. С. 1430–1439.
156. Ohmine I., Karplus M., Schulten K. Renormalized configuration interaction method for electron correlation in the excited states of polyenes // *J. Chem. Phys*. 1978. T. 68. № 5. С. 2298–2318.
157. Otsuka M., Mori Y., Takano K. Theoretical study on photophysical properties of 3'-hydroxyechinenone and the effects of interactions with orange carotenoid protein // *Chem. Phys. Lett*. 2016. T. 647. С. 95–102.
158. Pauli W. Über den Zusammenhang des Abschlusses der Elektronengruppen im Atom mit der Komplexstruktur der Spektren // *Zeitschrift für Phys*. 1925.
159. Petersilka M., Gossmann U.J., Gross E.K.U. Excitation energies from time-dependent density-functional theory // *Phys. Rev. Lett*. 1996.
160. Phillip D. и др. Quenching of chlorophyll fluorescence in the major light-harvesting complex of photosystem II: A systematic study of the effect of carotenoid structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1996.
161. Polívka T. и др. Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1999.
162. Polívka T., Sundström V. Ultrafast dynamics of carotenoid excited States-from solution to natural and artificial systems. // *Chem. Rev*. 2004. T. 104. № 4. С. 2021–71.
163. Polívka T., Sundström V. Dark excited states of carotenoids: Consensus and controversy // *Chem. Phys. Lett*. 2009.
164. Polívka T.T. и др. Spectroscopic properties of the carotenoid 3'-hydroxyechinenone in the orange carotenoid protein from the cyanobacterium *Arthrospira maxima*. // *Biochemistry*. 2005. T. 44. № 10. С. 3994–4003.

165. Popescu S., Rohrlich D. Quantum nonlocality as an axiom // *Found. Phys.* 1994.
166. Poterya V. и др. Hydrogen bond dynamics in the excited states: Photodissociation of phenol in clusters // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012. T. 14. № 25. С. 8936–8944.
167. Pulay P., Fogarasi G. Geometry optimization in redundant internal coordinates // *J. Chem. Phys.* 1992. T. 96. № 4. С. 2856–2860.
168. Punginelli C. и др. Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the Orange Carotenoid Protein // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2009. T. 1787. № 4. С. 280–288.
169. Rao B.K., Darsey J.A., Kestner N.R. Ab initio energy calculations for the intramolecular rotational potential of polyacetylene // *J. Chem. Phys.* 1983. T. 79. № 3. С. 1377–1380.
170. Renge I., Grondelle R. van, Dekker J.P. Matrix and temperature effects on absorption spectra of β -carotene and pheophytin a in solution and in green plant photosystem II // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 1996. T. 96. № 1. С. 109–121.
171. Ronneberg H. и др. Animal carotenoids 19. Alloporin, a new carotenoprotein // *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 1979.
172. Runge E., Gross E.K.U. Density-functional theory for time-dependent systems // *Phys. Rev. Lett.* 1984.
173. Salares V.R. и др. Mechanisms of spectral shifts in lobster carotenoproteins The resonance raman spectra of ooverdin and the crustacyanins // *BBA - Protein Struct.* 1979.
174. Schlegel H.B. Optimization of equilibrium geometries and transition structures // *J. Comput. Chem.* 1982. T. 3. № 2. С. 214–218.
175. Schmidt M.W. и др. General atomic and molecular electronic structure system // *J. Comput. Chem.* 1993.
176. Schulten K., Karplus M. On the origin of a low-lying forbidden transition in polyenes and related molecules // *Chem. Phys. Lett.* 1972. T. 14. № 3. С. 305–309.
177. Šebelík V. и др. Time-resolved two-photon spectroscopy of carotenoids // *Chem. Phys.* 2019.
178. Sedoud A. и др. The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher // *Plant Cell.* 2014. T. 26. № 4. С. 1781 LP – 1791.
179. Sham L.J., Kohn W. One-particle properties of an inhomogeneous interacting electron gas // *Phys. Rev.* 1966.
180. Shao Y. и др. Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006.
181. Shone C.C., Britton G., Goodwin T.W. The violet carotenoprotein of the starfish, *Asterias rubens* // *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 1979.
182. Snow R.L., Bills J.L. A simple illustration of the SCF-LCAO-MO method // *J. Chem. Educ.* 1975. T. 52. № 8. С. 506.

183. Song P., Ma F.C. Intermolecular hydrogen-bonding effects on photophysics and photochemistry // *Int. Rev. Phys. Chem.* 2013. T. 32. № 4. С. 589–609.
184. Stahl W., Ale-Agha N., Polidori M.C. Non-antioxidant properties of carotenoids // *Biol. Chem.* 2002.
185. Staleva H. и др. Mechanism of photoprotection in the cyanobacterial ancestor of plant antenna proteins // *Nat. Chem. Biol.* 2015. T. 11. С. 287.
186. Sutter M. и др. Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. T. 110. № 24. С. 10022–10027.
187. Tai J.C., Allinger N.L. Conformational analysis. 120. Small polyenes // *J. Am. Chem. Soc.* 1976. T. 98. № 25. С. 7928–7932.
188. Tanumihardjo S.A. Carotenoids and human health. , 2013.
189. Tavan P., Schulten K. Electronic excitations in finite and infinite polyenes // *Phys. Rev. B.* 1987. T. 36. № 8. С. 4337–4358.
190. Thrash R.J., Fang H.L.-B., Leroi G.E. ON THE ROLE OF FORBIDDEN LOW-LYING EXCITED STATES OF LIGHT-HARVESTING CAROTENOIDS IN ENERGY TRANSFER IN PHOTOSYNTHESIS* // *Photochem. Photobiol.* 1979. T. 29. № 5. С. 1049–1050.
191. Tlustý M., Hyland C. Astaxanthin deposition in the cuticle of juvenile American lobster (*Homarus americanus*): Implications for phenotypic and genotypic coloration // *Mar. Biol.* 2005.
192. Tomas GILLBRO and Richard J. Cogdell. CAROTENOID FLUORESCENCE // *Chem. Phys. Lett.* 1989. T. 158. № 3. С. 312–316.
193. Tozer D.J., Handy N.C. On the determination of excitation energies using density functional theory // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000.
194. Vaswani H.M. и др. Quantum Chemical Evidence for an Intramolecular Charge-Transfer State in the Carotenoid Peridinin of Peridinin–Chlorophyll–Protein // *J. Phys. Chem. B.* 2003. T. 107. № 31. С. 7940–7946.
195. Vershinin A. Biological functions of carotenoids - diversity and evolution // *BioFactors.* 1999. T. 10. № 2-3. С. 99–104.
196. Wade N. и др. Esterified astaxanthin levels in lobster epithelia correlate with shell colour intensity: Potential role in crustacean shell colour formation // *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 2005.
197. Wagner J.P., Schreiner P.R. London Dispersion in Molecular Chemistry - Reconsidering Steric Effects // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2015. T. 54. № 42. С. 12274–12296.
198. Walla P.J. и др. Excited-State Kinetics of the Carotenoid S₁ State in LHC II and Two-Photon Excitation Spectra of Lutein and -Carotene in Solution: Efficient Car S₁ fChl Electronic Energy Transfer via Hot S₁ States? † // 2002. С. 1909–1916.

199. Wassermann A. Proton-acceptor properties of carotene // *J. Chem. Soc.* 1954.
200. Wilson A. A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria // *PLANT CELL ONLINE*. 2006. T. 18. № 4. C. 992–1007.
201. Wilson A. и др. A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. T. 105. № 33. C. 12075–12080.
202. Wilson A. и др. Structural Determinants Underlying Photoprotection in the Photoactive Orange Carotenoid Protein of Cyanobacteria // 2010.
203. Wilson A. и др. Essential role of two tyrosines and two tryptophans on the photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2011.
204. Wyman G.M. The Cis-Trans Isomerization of Conjugated compounds // *Chem. Rev.* 1955. T. 55. № 4. C. 625–657.
205. Yan Y.J., Mukamel S. Femtosecond pump-probe spectroscopy of polyatomic molecules in condensed phases // *Phys. Rev. A.* 1990. T. 41. № 11. C. 6485–6504.
206. Yanai T., Tew D.P., Handy N.C. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP) // *Chem. Phys. Lett.* 2004. T. 393. № 1. C. 51–57.
207. Yaroshevich I.A.A., Krasilnikov P.M.M., Rubin A.B.B. Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations // *Comput. Theor. Chem.* 2015. T. 1070. C. 27–32.
208. YATES K. HÜCKEL MOLECULAR ORBITAL THEORY // *Hückel Molecular Orbital Theory.* , 1978. C. 27–87.
209. Young A.J., Lowe G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2001. T. 385. № 1. C. 20–7.
210. Young N.M., Williams R.E. The circular dichroism of ovooverdin and other carotenoproteins from the lobster *Homarus americanus*. // *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1983.
211. Zagalsky P.F. A study of the astaxanthin-lipovitellin, ovooverdin, isolated from the ovaries of the lobster, *Homarus gammarus* (L.) // *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 1985.
212. Zagalsky P.F. и др. Studies on a blue carotenoprotein, linckiacyanin, isolated from the starfish *Linckia laevigata* (Echinodermata: Asteroidea) // *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 1989. T. 93. № 2. C. 339–353.
213. Zagalsky P.F., Jones R. Quaternary structures of the astaxanthin-proteins of *Velella velella*, and of α -crustacyanin of lobster carapace, as revealed in electron microscopy // *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 1982.
214. Zhang H. и др. Molecular Mechanism of Photoactivation and Structural Location of the Cyanobacterial Orange Carotenoid Protein // *Biochemistry.* 2014. T. 53. № 1. C. 13–19.

215. Zhang H. и др. Native mass spectrometry and ion mobility characterize the orange carotenoid protein functional domains // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2016. T. 1857. № 6. С. 734–739.
216. Zhao G.J., Han K.L. Hydrogen bonding in the electronic excited state // *Acc. Chem. Res.* 2012. T. 45. № 3. С. 404–413.
217. Zhao Y., Truhlar D.G. Assessment of density functionals for π systems: Energy differences between cumulenes and poly-yenes; proton affinities, bond length alternation, and torsional potentials of conjugated polyenes; and proton affinities of conjugated Schiff bases // *J. Phys. Chem. A.* 2006. T. 110. № 35. С. 10478–10486.
218. Zhao Y., Truhlar D.G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function // *Theor. Chem. Acc.* 2008. T. 120. № 1–3. С. 215–241.
219. Zigmantas D. и др. Carotenoid to chlorophyll energy transfer in the peridinin-chlorophyll-a-protein complex involves an intramolecular charge transfer state. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. T. 99. № 26. С. 16760–5.